

**Zellfokussierung in *C. elegans*:
Mutagenese und Mutantenlese zur Isolierung neuer
Kandidaten-Gene**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Anne Wiekenberg
aus Göttingen

1. Referent:	Professor Dr. Ralf Schnabel
2. Referent:	Professor Dr. Martin Korte
eingereicht am:	14.05.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am:	26.09.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Memar, N., Martin, K., Wiekenberg, A., & Schnabel, R.: A screen for temperature-sensitive embryonic lethal mutations affecting cell focussing in *Caenorhabditis elegans*. (Poster) 673A. International Worm Meeting, UCLA, Los Angeles, USA (2009).

Martin, K., Memar, N., Wiekenberg, A., Schiemann, S., Hennig, C., & Schnabel, R.: A screen for temperature-sensitive embryonic lethal mutants affecting cell migration in *Caenorhabditis elegans*. (Poster) 183 *C. elegans*: Development and Gene Expression, EMBL, Heidelberg, Deutschland (2010).

Inhaltsverzeichnis

Dank.....	5
Zusammenfassung.....	6
Einleitung.....	8
Ergebnisse.....	17
Mutagenesen und Mutantenlesen.....	17
Zelllinienanalyse.....	19
Auswertung der Mutagenese und Mutantenlese.....	19
Vier Beispiele für Schicksalsmutationen.....	26
Bereitstellung der Mutanten für die Worm Community.....	42
Zellfokussierungskandidaten.....	43
<i>t3205 (let-19)</i>	43
Der Phänotyp von <i>t3205</i>	43
Ausschluss von <i>t3205</i> als neues Allel des Gens <i>glp-1</i> oder <i>apx-1</i>	53
Identifizierung von <i>t3205</i> als neues Allel des Gens <i>let-19</i>	54
LET-19 als Teil des Mediator-Komplexes in <i>C. elegans</i>	55
Expression von <i>let-19::H2B::GFP</i> im Embryo.....	59
<i>t3206 (sem-4)</i>	61
Der Phänotyp von <i>t3206</i>	61
Klonierung von <i>t3206</i>	71
Funktion von <i>sem-4</i> in <i>C. elegans</i>	84
Hat <i>t3206</i> Einfluss auf potentielle SEM-4 Interaktionen ?.....	86
Diskussion.....	92
Material und Methoden.....	96
Literaturverzeichnis.....	114
Anhang.....	118

Dank

Dank

Ich danke meinem Mentor Prof. Ralf Schnabel für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Des weiteren möchte ich mich für das spannende Thema, sowie die sehr gute Hilfe und Betreuung bedanken, ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre, diese Arbeit zu erstellen.

Bei Prof. Martin Korte bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferat, sowie bei Prof. Hans-Henning Arnold für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Henning Schmidt für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft besonders bei den molekular-biologischen Aspekten des Themas. Für die unermüdlichen Bemühungen die Bioinformatik auf dem neuesten Stand zu halten, und auch auf die kleinen „Mäkeleien“ einzugehen, danke ich ganz herzlich Christian Hennig. Ohne Christian wäre diese Arbeit nicht realisierbar gewesen.

Bei meinen „Mitreiterinnen“ Katharina Luthe und Nadin Memar bedanke ich mich besonders. Die Zusammenarbeit bei der Mutagenese, sowie das Teilen eines Labors hat dazu geführt, dass wir sehr viel Zeit zusammen miteinander verbracht haben, die ich sehr genossen habe. Sowohl der Anteil an wissenschaftlichen Diskussionen wie auch den eher privaten Gedankenaustausch haben mir immer wieder weitergeholfen.

Ein ganz großer Dank gilt Christiane Lindemann, Annette Otto und Cathrin Struck für ihre Unterstützung bei Konstrukten, DNA-Isolierung und Wurm-Kultivierung/-Sicherung. Ohne diesen Beitrag wäre die Arbeit in diesem Umfang nicht machbar gewesen.

Für die Bereitstellung und Nutzungsmöglichkeit des Worm-Sorters danke ich Prof. Tony Hyman (MPI Dresden). Dr. Robert Geffers (HZI Braunschweig) danke ich, dass wir seinen Roboter zum replizieren der 96-Well-Platten nutzen durften. Prof. Oliver Hobert danke ich für die WGS-Daten der Mutanten *t3205* und *t3206*, sowie seinem Post-Doc Richard Poole bei dessen Hilfe bei der Auswertung der Daten. Für die Überlassung des Deletionsallels *tm547* danke ich Prof. Shohei Mitani. Ohne diese Unterstützungen wäre die Durchführung des Projekts nicht möglich gewesen.

Als letztes gilt mein Dank Sabrina Schiemann und Madeleine Ehmke bei der teilweisen Unterstützung der Mutagenese und Mutantenlese. Für die Unterstützung bei den Projekten bei *t3205*, *t3206* und *t3208* danke ich Jana Zenk, Sophie Ziegler und Marius Klangwart.

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war biologische Form, und speziell deren Entstehung, zu verstehen. Schnabel et al. (2006) haben die Hypothese der Zellfokussierung formuliert, die besagt, dass Zellen ihrer Identität entsprechend einen Positionswert entwickeln und diesen nutzen sich relativ zu ihren Nachbarn zu orientieren, um an ihre Position zu migrieren. Sollte dieser Prozess gestört sein, können Zellen nicht mehr an ihre korrekte Position wandern, behalten aber ihr natives Schicksal. In einem vorherigen Mutagenese-Ansatz zur Identifizierung des Zellfokussierungssystems mittels Mutanten konnte bisher eine Zellfokussierungsmutante isoliert werden, die in den grundlegenden Zuckerstoffwechsel (Glykoprotein-Biosynthese) involviert ist. Dies indiziert, dass die Zellidentitäten und -positionen durch Glykoproteine definiert werden könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten unter anderem zwei weitere Mutanten isoliert werden, die im Zusammenhang mit der Zellfokussierung stehen. Mit *t3205* wurde ein neues Allel von *let-19* isoliert, einem Protein aus der CDK-Domäne des Mediator-Komplexes. Das zweite Allel *t3206* ist eine Mutation in *sem-4*, einem Homeobox-Gen, das HOXC-Gene regulieren soll. Da beide Gene für Transkriptionsfaktoren kodieren, konnte über den zugrunde liegenden zellulären, biochemischen Mechanismus der Zellfokussierung keine neue Erkenntnis gefunden werden. Jedoch zeigen beide Mutationen neue Erkenntnisse über die Exekution der Zellposition im Zusammenhang mit der Zellidentität. Die drei ungelösten Rätsel der Zellfokussierung sind zum einen, wie entstehen Zellidentitäten, wie sind Identität und Positionswert miteinander gekoppelt und wie erreicht eine Zelle mit einer bestimmten Identität und Positionswert ihre korrekte Position? Außerdem konnte eine neue Hypothese der ursprünglichen Funktion der Hox-Gene erstellt werden.

Die Mutante *let-19(t3205)* zeigt zwar Schicksalstransformationen im prä-morphogenetischen Stadium, jedoch nehmen die Zellen nahezu die Positionen ein, die sie im Wildtyp innehaben. Nach umfassenden Analysen konnte ich zeigen, dass in dieser Mutante die Schicksalstransformationen keinem Muster folgen und die Fehlplatzierung der Zellen genauso chaotisch erfolgt. Dies zeigt, dass in dieser Mutante die Kopplung von Zellidentität und -position getrennt sein muss. Es bleibt jedoch offen, inwiefern LET-19 eine spezielle Funktion einnimmt, noch wie ein zugrundeliegender Mechanismus aussehen könnte. Der Phänotyp dieser Mutante gibt allerdings Möglichkeiten zur Spekulation über die Etablierung der Zellposition. Da die Zellidentität über binäre Logik (Kaletta, T., Schnabel, H. und Schnabel, R., 1997) erfolgt, ist es immer noch möglich, dass die Zellposition von der regionalen Zellidentität abhängig ist und hierarchisch strukturiert wird.

Im Gegensatz dazu konnte ich für *sem-4(t3206)* zeigen, dass in dieser Mutante der Ordnungsprozess auf der a-p-Achse gestört ist. Da *sem-4* zu den Hox-Genen gehört und wahrscheinlich andere HOXC-Gene reguliert, ist diese Mutante mit ein erster Hinweis darauf, dass Hox-Gene in den Prozess der Zellfokussierung im Embryo involviert sind. Da bisher nur die Rolle der Hox-Gene bei der homeotischen Segmentierung der Körperachse und des neuronalen Systems (z.B. *Drosophila melanogaster*) bekannt ist, ist es umso interessanter, da *C. elegans* nicht segmentiert ist. Auch die Zellanordnung auf der a-p-Achse entspricht der späteren Funktion in der Larve (Harris, J. et al., 1996). Es ist somit

Zusammenfassung

möglich, dass *sem-4* die Zellanordnung auf der a-p-Achse über Regulation anderer HOXC-Gene reguliert. Damit würde die frühe Funktion der Hox-Gene in *C. elegans* in Zusammenhang mit der Zellfokussierung stehen.

Beide Mutanten zeigen, dass Zellfokussierung ein hoch regulierter Prozess sein muss, an dem unterschiedlichste Signalwege teilhaben und der wahrscheinlich über mehrere Instanzen (regionale Identität vs. zelluläre Identität) hierarchisch geordnet sein muss.

Einleitung

Wie entsteht Form und wie wird sie vererbt?

Schon Aristoteles (* 384 v. Chr.; † 322 v. Chr.) beschäftigte sich mit dieser einfachen, jedoch schwer zu beantwortende Frage. Paracelsus beschrieb 1538 (*De natura rerum*) erstmals, dass durch das Sperma ein Homunkulus (Abbildung 1) in den Uterus der Frau gepflanzt wird, um dort auszureifen.

Diese Theorie wurde unter anderem 1885 durch August Weismanns Keimplasma-Theorie widerlegt. Der Begriff der Embryogenese wurde eingeführt und damit stellte sich die Frage, wie aus einer Zelle ein komplexer Organismus entstehen kann, der zudem reproduzierbar seine Form beibehält. Die Frage ist immer noch aktuell, jedoch wurde die Beantwortung mit zunehmenden Verständnis der Organismen, sowie der zugrunde liegenden Genetik komplexer. Oberflächlich betrachtet ist mit mehr oder weniger dem gleichen Ausgangsmaterial (z.B. konservierte Gene) eine scheinbar unendliche Vielfalt möglich, welche in ihren Arten (Zelltypen, Tierarten, ...) jedoch stabil bleibt.



Um die Formentstehung zu erklären, ist ein Verständnis der Embryogenese notwendig, da während dieser alle Grundlagen für die spätere Form angelegt werden.

Abbildung 1:

Um dem Rätsel der Form etwas näher zu kommen, habe ich als Untersuchungsobjekt *C. elegans* gewählt. Der Wurm wurde 1974 von Sydney Brenner endgültig als Modellorganismus etabliert und galt lange als das Paradebeispiel der autonomen Entwicklung.

Vorstellung eines Homunkulus innerhalb eines Spermiums. Der Mensch ist schon komplett angelegt und muss im Uterus der Frau nur noch ausreifen.

Abbildung aus Nicolaas Hartsoecker's *Essai de dioptrique* (1694).

John Sulston zeigte 1983, dass *C. elegans* eine invariante Zelllinie (Abbildung 2) mit einer konstanten Anzahl an Zellen hat. Somit war *C. elegans* das Beispiel, wie Form durch so genannte Determinanten (Reserveidioplasma, Roux, 1885) definiert werden könnte. Dies bedeutet für *C. elegans*, dass durch ein determiniertes Zellteilungsmuster die Zellen an den richtigen Ort positioniert werden würden.

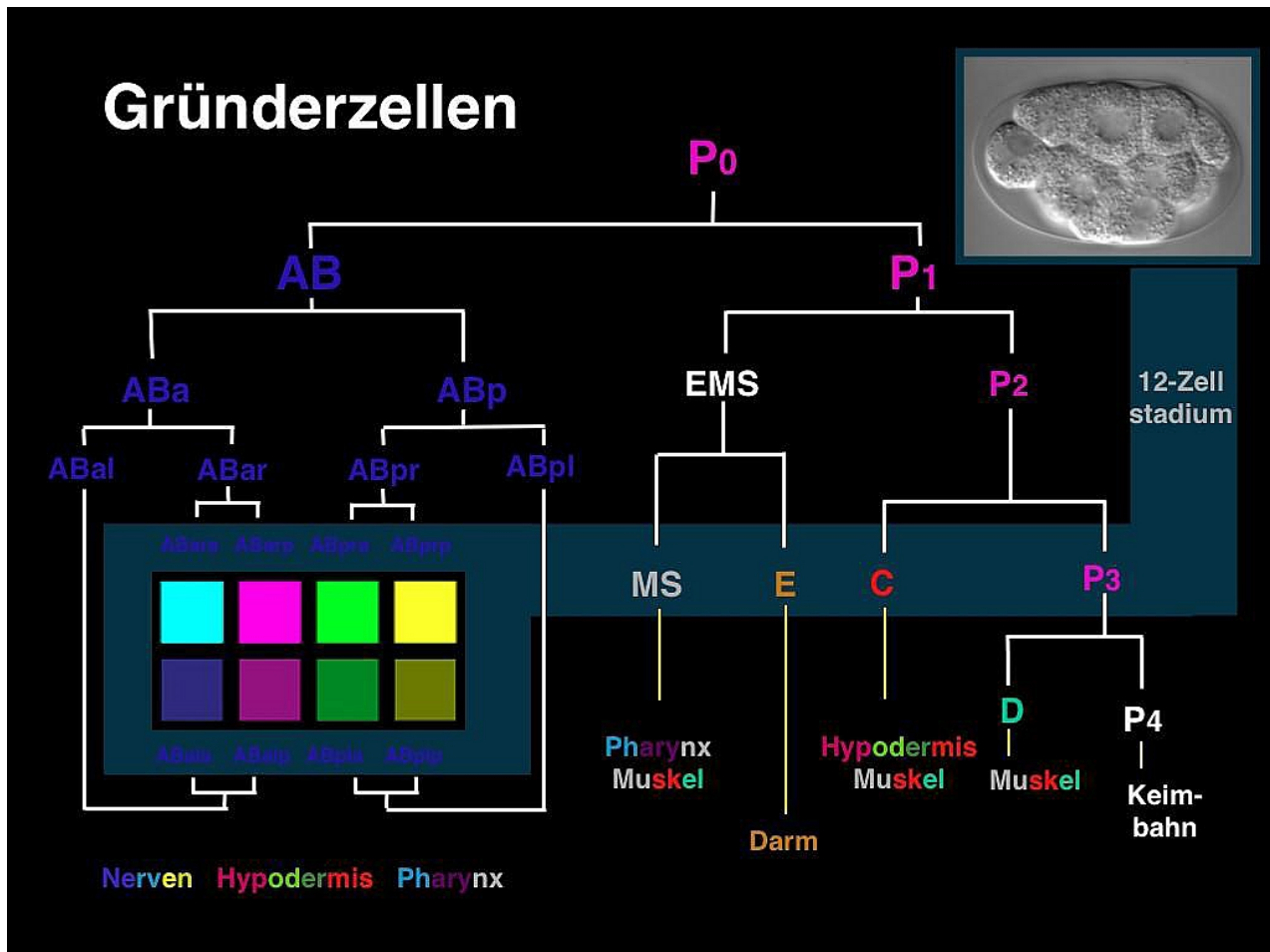


Abbildung 2: Ausschnitt aus der frühen embryonalen Zelllinie von *C. elegans*.

Die invariante Zelllinie zeigt, dass jeder Zelle aufgrund ihrer Herkunft ein Schicksal zugewiesen wird. Die einzelnen Gewebearten setzen sich aus Zellen unterschiedlichster Herkunft zusammen. Die einzige Ausnahme bildet der Darm, der monoklonal aus der E-Zelle hervorgeht, sowie die Keimbahn, deren Vorläuferzellen aus den P-Zellen entstehen. *Abbildung von Ralf Schnabel.*

Mit Aufkommen der 4-D-Mikroskopie (Bruce Alberts, 1989 und Ralf Schnabel, 1997) und einer genaueren Untersuchung der Embryogenese konnten Ralf Schnabel und Mitarbeiter (Hutter, H. und Schnabel, R., 1994) zeigen, dass anders als bisher vermutet, die Embryogenese von *C. elegans* weder determiniert ist, noch die Zellen durch ihre Abstammung innerhalb der Zelllinie einfach durch Teilung an ihren richtigen Platz gelangen. Zusammen mit Marcus Bischoff konnte durch Blastomer-Rekombination (*C. elegans* Zellkultur, Schnabel, R. et al., 2006 und Bischoff, M. und Schnabel, R., 2006) gezeigt werden, dass Zellschicksale induziert werden und zudem die Zellen sich ihrem Schicksal entsprechend räumlich sortieren. In Zusammenarbeit mit Hans Meinhardt entstand so die Zellfokussierungshypothese, analog zur Elektrofokussierung (Schnabel, R. et al., 2006). Damit zeigte sich, dass gerade der Wurm mit seiner festgelegten Zellzahl möglicherweise ein gutes Modell ist, um Form und deren Vererbung zu studieren. Durch einfache Mutationen ist seine Form veränderlich und zeitgleich können die Änderungen einzelnen Zellen zugeordnet werden.

Einleitung

Zellfokussierung

Durch die erhöhte zeitliche sowie räumliche Auflösung, die die 4-D-Mikroskopie ermöglichte, konnten Ralf Schnabel und Mitarbeiter (Bischoff, M. und Schnabel, R., 2006) zeigen, dass Zellen in *C. elegans* nicht durch ihre Teilungsrichtung platziert werden, sondern durch eine Kombination von Zellteilung und -migration. Für die Platzierung einer Zelle ist die Zellteilungsrichtung (findet immer in a-p-Richtung statt) immer relevant, da sie durch diese auch fehlplatziert werden kann. Diese Fehlplatzierungen durch die Zellteilung muss durch Zellmigrationen ausgeglichen werden. Um diese Beobachtung zu beschreiben und um zu verstehen, wie ein derart reproduktives Muster erreicht wird, entwickelte Hans Meinhardt die Zellfokussierungshypothese. Diese besagt, da die Zellen aktiv wandern, muss jede Zelle eine eigene Zellidentität besitzen, und darin beinhaltet, eine Positionsinformation. Befinden sich nun mehrere Zellen in einem Feld, müssen Zellen miteinander agieren, um ihre Position innerhalb ihres Feldes zu bestimmen.

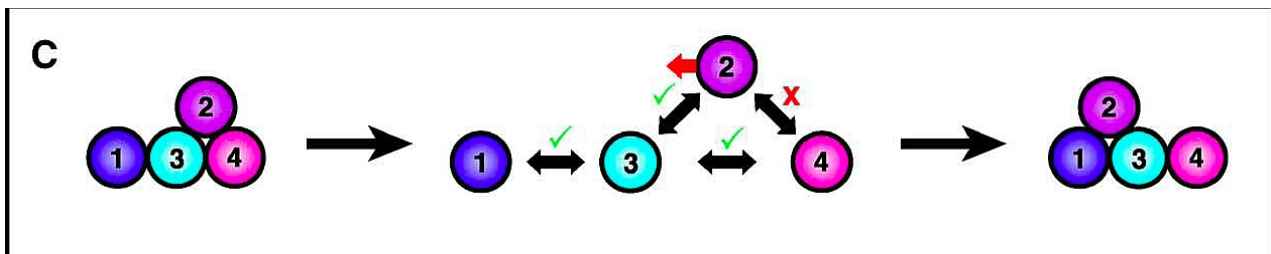


Abbildung 3: Zellfokussierung.

Aufgrund ihrer Zellidentität (hier in Zahlen 1-4 angegeben) interagieren die Zellen miteinander und ermitteln so ihre Position innerhalb eines Feldes. Sollte die Position nicht mit der Zellidentität übereinstimmen, also ein oder mehr Nachbarn die falsche Identität haben, wird innerhalb der Gruppe solange über Zellmigration sortiert, bis alle die richtige Positionen innehaben. *Abbildung aus Bischoff, M. und Schnabel, R., 2006*

Dabei findet ein Ordnungsprozess statt, während dessen Zellen ihre eigene Position über ihre Nachbarn beurteilen (Abbildung 3). Die dafür benötigte Zellidentität wird während der Embryogenese durch binäre Induktionen festgelegt (Kaletta, T., Schnabel, H., und Schnabel, R., 1997). Das Zellfokussierungsmodell bedeutet für die Embryogenese von *C. elegans*, dass Zellen ihrem Schicksal entsprechend aktiv an ihre Position migrieren.

glp-1/apx-1: eine Hypothese findet Anwendung

Die erste Zellteilung in *C. elegans* ist asymmetrisch und die anterior-posterior (a-p) Achse ist schon von den PAR-Proteinen (kortikal) sowie PIE-1/MEX-5/... (cytoplasmatisch) festgelegt (Ken Kemphues, 1988).

Während der weiteren Entwicklung werden Zellen durch GLP-1/APX-1 und das WNT-Signal (MOM-2/MOM-5) induziert. So wird APX-1 in der P1-Zelle exprimiert, während der Rezeptor GLP-1 in AB exprimiert wird. Diese Berührung der AB- und P1-Zelle führt zu einer Induktion des ABp Schicksals. ABp wird zudem durch das WNT-Signal induziert. WNT (MOM-2) wird von der P2-Zelle sekretiert. Damit ist die P-Zelle Quelle der posterioren Polarität und induziert damit die nächste a-p-Induktion von ABa und ABp. Damit sind dann im 4-AB-Zellstadium die Grundsicksale von ABala, ABarp, ABpla und

Einleitung

ABprp angelegt. Im weiteren werden durch GLP1-Signale, über z.B. die MS-Zelle die links-rechts Achse festgelegt. Diese fünf Induktionen führen zu den acht AB-Grundschnitten (Abbildung 4).

Die Entwicklung von *C. elegans* ist insofern außergewöhnlich, dass sich mit den ersten drei Teilungsrunden (bis zum 12-Zeller) mit fünf Induktionen alle Körperachsen definieren.

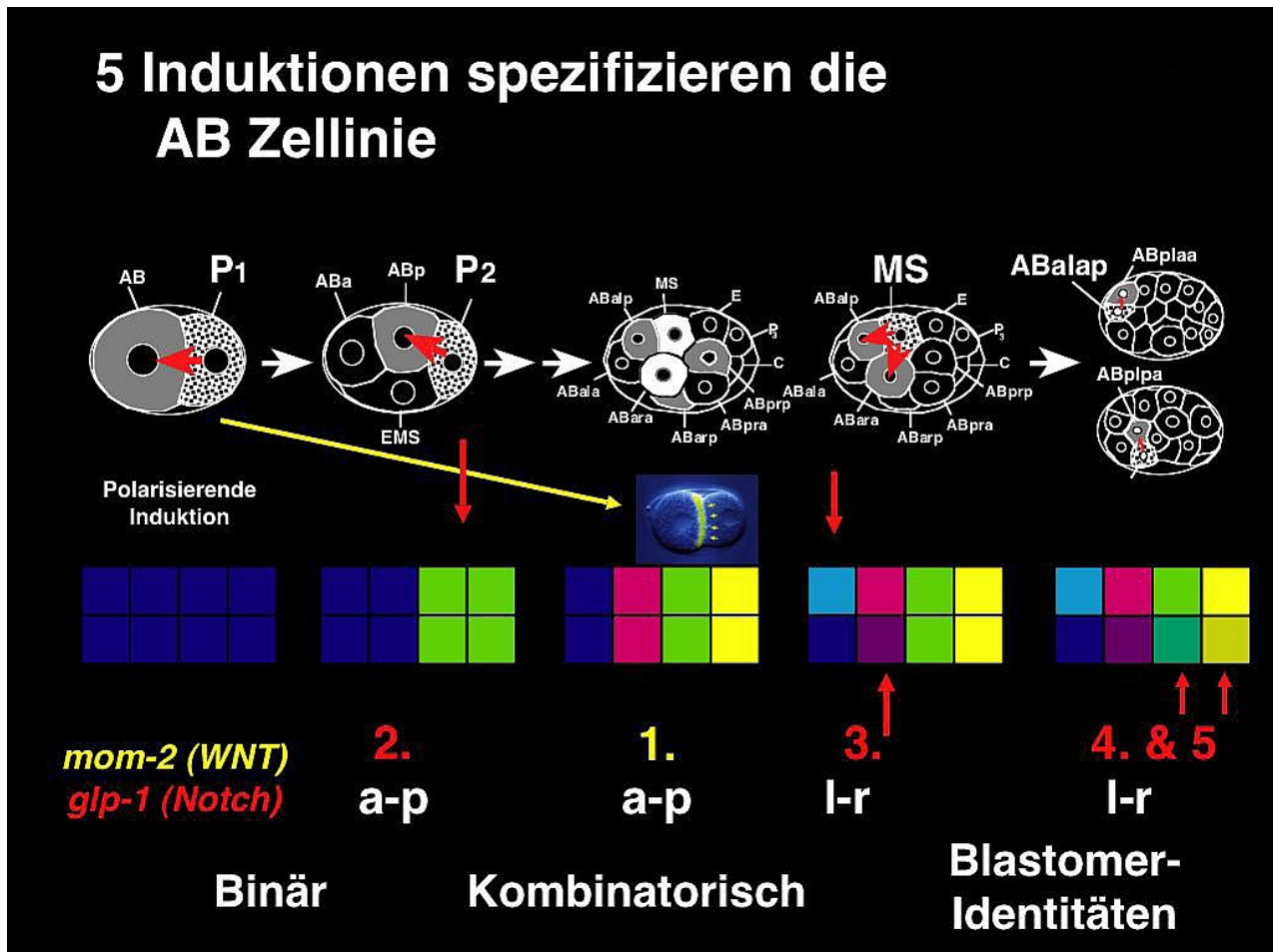


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Induktionen zur Definition der Körperachsen in *C. elegans*.

Die Körperachsen werden in fünf Induktionen festgelegt. Hiervon sind vier der fünf Induktionen von dem Notch/Delta-Signalweg (*glp-1/apx1*) abhängig, und eine vom WNT-Signal. Die Definition der links-rechts Körperachse findet in den acht AB-Gründerzellen statt (3.-4. Induktion). Die acht Gründerzellen definieren später die acht charakteristischen ABxxx-Regionen des prämorphogenetischen Stadium (256-AB-Zellstadium). Abbildung von Ralf Schnabel.

Ein schönes Beispiel für Zellfokussierung (Zellen wandern ihrer Identität entsprechend an ihre richtige Position) sind die Mutationen in dem Notch-Rezeptor GLP-1 und dessen Ligand APX-1. Beide Proteine werden im 2-Zell-Embryo exprimiert. Zwei frühe Induktionen sind grundlegend, damit im 12-Zellstadium alle acht AB-Gründerzellen richtig induziert sind. Aus diesen acht Gründerzellen gehen später die acht AB-Regionen des Embryos hervor, die charakteristische Formen im prämorphogenetischen Stadium des Wildtyp-Embryos einnehmen (Abbildung 5).

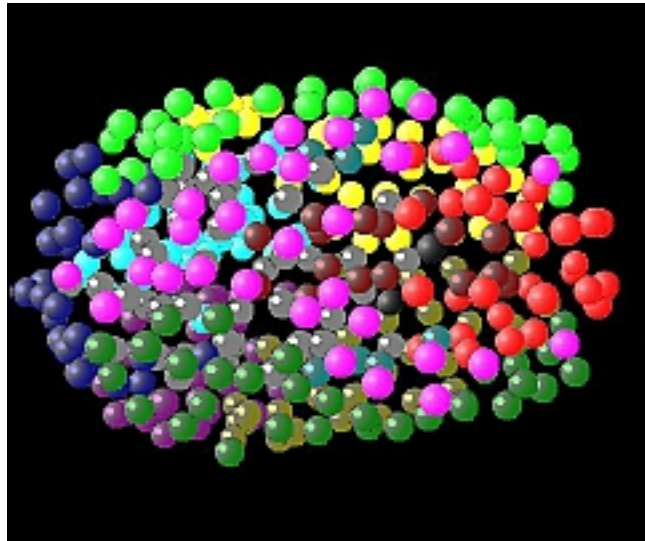


Abbildung 5: 3-D-Repräsentation eines Wildtyp-Embryos (AWCH_N2_1).

Die Kugeln repräsentieren schematisch alle Original-Zellen eines Wildtyp-Embryos im prämorphogenetischen Stadium. Die Nachkommen der acht AB-Gründerzellen sind jeweils in derselben Farbe eingefärbt. Man erkennt, dass dies Nachkommen charakteristische Regionen bilden (z.B. ABarp-Zellen (pink) bilden eine Y-Struktur), die stabil in unterschiedlichen Wildtyp-Embryonen gebildet werden.

Ist GLP-1 mutiert, findet man nur noch zwei der acht Regionen (die sechs übrigen sind in die Identitäten der beiden verbleibenden Regionen transformiert worden), wohingegen für Mutationen in APX-1 bisher Transformationen von acht Regionen auf vier Regionen gezeigt wurden.

Bei *glp-1*- und *apx-1*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass bestimmte Schicksale nicht induziert werden können. Die Zellregionen mit einer redundanten Zellidentität im Embryo versuchen diese „neue“ Position (die ihrem redundanten Schicksal entspricht) zu erreichen. Dies hat im Fall von z.B. *glp-1* zur Folge, dass nur die Schicksale ABara und ABalp induziert werden. Diese beiden Regionen befinden sich beide im anterioren Teil des Embryos, wobei ABala die weitesten anteriore Position einnimmt. In einem *glp-1*-mutanten Embryo kann man beobachten, dass posteriore AB-Nachkommen anterior wandern und die typische Elongation von z.B. ABpra ausbleibt, wohingegen die im Wildtyp anterior liegende Region ABalp posterior migriert (Bischoff, M. und Schnabel, R., 2006). Als Konsequenz der Transformationen im Zusammenhang mit der Zellfokussierungshypothese, findet eine Neuordnung statt, die auf zwei Schicksalen beruht. Eigentlich sollte der Ligand, der den Rezeptor induziert denselben Effekt haben. Interessanter Weise zeigen *apx-1*-Embryonen nicht denselben Phänotyp wie *glp-1*-Embryonen (Abbildung 6). Dieses Ergebnis lässt zwei Schlussfolgerungen zu. Erstens: APX-1 ist nur der Ligand von GLP-1 bei der ersten Induktion und die späteren Induktionen, z.B. über die MS-Zelle werden von einem anderen Liganden induziert. Zweitens: Die *apx-1*-Mutante ist kein Null-Allel, dass heißt eine Restaktivität von APX-1 bleibt erhalten und ein Teil der Induktionen kann erfolgen.

Einleitung

Quantitative Erfassung des Problems: Bioinformatik

Als Grundlage aller bioinformatischen Auswertungen dienen Zelllinienanalysen. Hierbei werden die 4-D-mikroskopischen Aufnahmen für jede Zelle einzeln verfolgt und die Positionen mit dem Programm SIMI°Biocell aufgezeichnet. Aus diesen Dateien lassen sich dann die Koordinaten aller Zellen zueinander bestimmen, auf deren Grundlage Distanzen, Winkel, etc. berechnet werden können. In den 3-D-Repräsentationen (Abbildung 5) entspricht somit jede Kugel den Originaldaten aus den 4-D-Aufnahmen.

Durch das Einfärben der Zellen in der 3-D-Repräsentation und konventionellen Nachweisen, wie Antikörperfärbungen, für Schicksalstransformationen, kann man die Neuordnung der Zellen sehen. Eine quantitative Aussage über Positionen der Zellen innerhalb des Embryos ist jedoch so gut wie nicht möglich. Aus diesem Grund überlegte sich Ralf Schnabel zusammen mit Arend Hintze (Dissertation, 2006) eine Möglichkeit die Positionen der Zellen im Embryo zueinander abstrakt darzustellen und in Zahlen zu fassen. Hierzu entwickelte Arend Hintze ein Programm, mit dem man die Abstände aller AB-Zellen zueinander vergleichen kann. Als Referenz dient der Wildtyp und alle abweichenden Distanzen werden als fehlerhaft interpretiert. Die absoluten Beträge aller Distanzen der drei Raumachsen im Mittelwert ergeben einen Wert, den RMS (*root mean square*). Da diese Zahlen zwar aussagekräftig sind, jedoch sehr abstrakt, hat Ralf Schnabel eine weitere Methode aus der Proteinbiochemie (Bignone, 2001) übernommen, um diese Werte grafisch darzustellen: Die Distanzkarte (Abbildung 6). In einer Distanzkarte werden an den beiden Seiten (X- Achse oben und Y-Achse links) alle AB-Zellen eines bestimmten Zellstadiums gelistet, so dass jede Zelle (inklusive sich selbst) jeder Zelle gegenübersteht. Dann wird in einem Farbcode die jeweilige Distanz (vektorieller Betrag aller drei Raumachsen) der beiden Zellen zueinander dargestellt. Rot: Die Zellen befinden sich in der Matrix am selben Ort. Grün: Die Zellen sind 100% Embryolänge (max. Distanz) voneinander entfernt. Wendet man nun diese Methode auf *glp-1*- oder *apx-1*-Embryonen an, ist der Effekt verblüffend. Die Muster, die im Wildtyp von einzelnen Regionen gebildet werden, werden in *glp-1*-Distanzkarten vervierfacht (nur noch das ABala und ABalp-Muster), während auch in *apx-1*-Distanzkarten deutlich zu sehen ist, dass die posterioren Schicksale in anteriore Schicksale transformiert wurden (Abbildung 6).

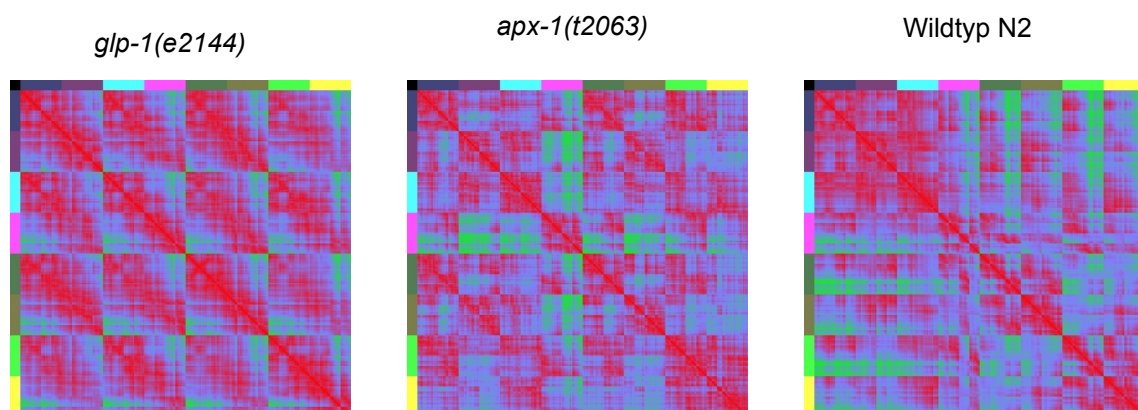


Abbildung 6: 3-D-Distanzkarten von *glp-1(e2144)*, *apx-1(t2063)* und dem Wildtyp-Konsensus.

Bei diesen Karten sind alle 256 AB-Zellen (in Regionen aufgeteilt) in ihrem Distanzbetrag (x-, y- und z-Achse werden berücksichtigt) betrachtet. Dabei fällt auf, dass bei der Wildtyp-Distanzkarte die anterioren

Einleitung

Regionen ABala, ABalp und ABara relativ nahe beieinander liegen (Farbcode: Rot-blau-grün \Leftrightarrow 0% Eilänge-Differenz-50% Eilänge-Differenz-100%-Eilänge-Differenz), wohingegen (der 3-D-Repräsentation entsprechend) die anderen Regionen elongieren müssen, da die Distanzen zu den anterioren Zellen zunehmen. Vergleicht man diese Karte nun mit den Karten von *glp-1* und *apx-1* (nach Schnabel, R. et al., 2006), kann man sehen, dass in *glp-1* das erste Quadrat der Wildtyp-Karte achtfach auftritt (ABala gegen ABalp). Dies spiegelt wieder, dass sich nach den fehlenden Induktionen, die Zellen ihrem redundanten Schicksal entsprechend verhalten und nur noch die ABala- und ABalp-Regionen gebildet werden. Dahingegen kann man in der Distanzkarte von *apx-1* erkennen, dass die Zellen sich anterior sammeln (rot und blau überwiegen) und nur noch die ABarp-Region (pink) elongiert.

Da bei *glp-1*- und *apx-1*-Mutationen besonders die Lage der Zellen in Richtung der x-Achse verschoben ist (a-p Achse), zeigt besonders die spezielle Distanzkarte, die nur die x-Distanzen berücksichtigen, das neue Muster (Abbildung 7).

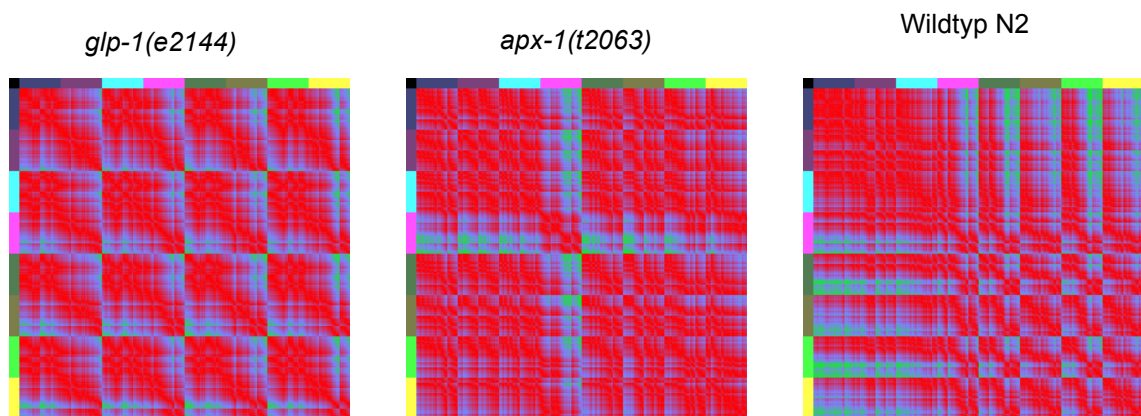


Abbildung 7: only x-Distanzkarten von *glp-1*, *apx-1* und dem Wildtyp.

Da GLP-1/APX-1 anterior-posterior Schicksale induzieren, ist der Vergleich zu dem Wildtyp besonders gut in Distanzkarten zu erkennen, die nur die x-Distanzen berücksichtigen. Besonders in der *apx-1*-Distanzkarte wird das blau-grüne Kreuz der ABarp-Region hervorgehoben.

Eine weitere Herausforderung war es, die Unterschiedlichkeit der Distanzkarten zueinander grafisch zu veranschaulichen. Durch den RMS und die beiden Distanzkarten sieht man zwar, dass *glp-1* sich sehr vom Wildtyp unterscheidet (RMS *glp-1*: 0,25; RMS Wildtyp: 0,06), jedoch ist auf der Distanzkarte schwer zu erkennen, welche Regionen am meisten abweichen. Dazu werden sogenannte Differenzkarten generiert. Differenzkarten entstehen, wenn man eine Distanzkarte von einer anderen abzieht. In diesem Fall werden Zellen mit denselben Distanzen zueinander schwarz dargestellt, während Zellen, deren Distanzen weit voneinander abweichen über blau bis hin zu gelb/weiß eingefärbt sind (Abbildung 8). Dies ermöglicht es, auf einen Blick, die am weitesten fehlplatzierten Zellen, bzw. Regionen zu erkennen.

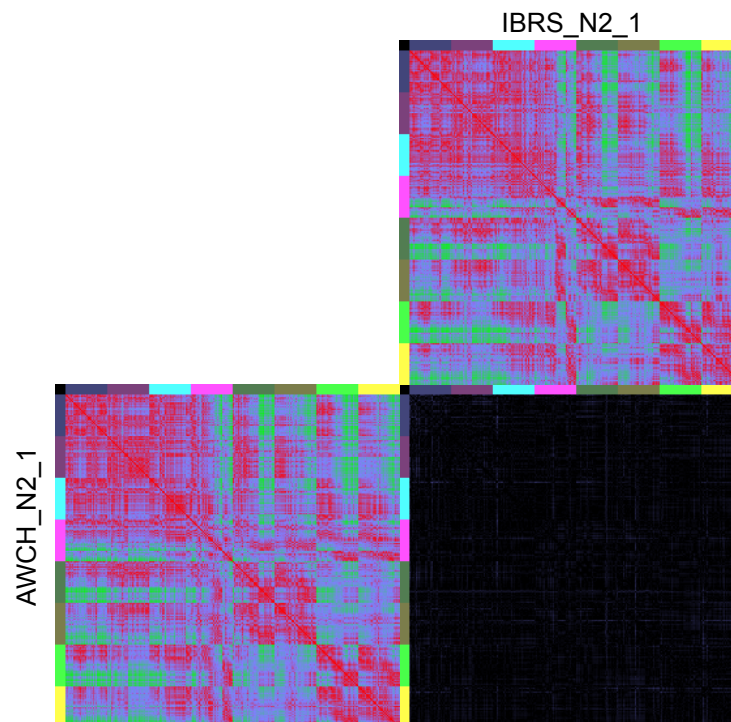


Abbildung 8: Beispiel einer 3-D-Differenzkarte zweier Wildtyp-Embryonen zueinander.

Vergleicht man zwei unterschiedliche Wildtyp-Distanzkarten miteinander, so kann man die Differenzkarte bilden, indem die Bilder voneinander abgezogen werden. Bestehen keine Unterschiede in der Distanz der Zellen zueinander, wird dieses schwarz dargestellt. Der Farbverlauf reicht über blau nach gelb, je stärker die Distanzen voneinander abweichen. In dieser Differenzkarte kann man das natürlich Rauschen erkennen, da natürlich keine 100% Übereinstimmung zwischen den Wildtyp-Embryonen besteht. Diese Abweichungen sind jedoch minimal und beinhalten individuelle Abweichungen bei der Zelllinienanalyse.

Arend Hintze hat seine Berechnungen ursprünglich mit einzelnen Wildtyp-Embryonen durchgeführt. Dabei fällt auf, dass alle Wildtyp-Embryonen eine sehr hohe Ähnlichkeit haben, jedoch geringe Unterschiede bei der Berechnung einzelner Mutanten zu unterschiedlichen Wildtyp-Embryonen beobachtet werden konnten. Um die natürliche Varianz, die schon in den Wildtypen auftritt, als Standardabweichung in die bioinformatischen Berechnungen einfließen lassen zu können, hat Christian Hennig einen neuen synthetischen Wildtyp-Embryo generiert. Hierzu hat er die Distanzen von fünf Wildtyp-Embryonen gemittelt und daraus einen sogenannten Konsensus-Embryo erstellt. Da die Distanzen in Beträgen gerechnet werden, können bei diesem Verfahren keine Koordinaten ermittelt werden, und so ist es nur möglich den Konsensus-Embryo als Distanzkarte darzustellen und nicht als 3-D-Repräsentation. Dieses Verfahren erwies sich als so effektiv, dass in dieser Arbeit alle Berechnungen für Distanz- und Differenzkarten mit dem Wildtyp-Konsensus durchgeführt wurden, soweit nichts anderes beschrieben wird.

Bekannte Zellfokussierungsmutanten

Nimmt man diese Erkenntnisse und Methoden nun zusammen, stellt sich die Frage, ob es in *C. elegans* auch reine Zellmigrationsmutanten gibt, die Aufschluss darüber geben

Einleitung

könnten, wie Zellen ihre Positionen finden, bzw. ihre Zellidentität anderen Zellen mitteilen. Aus diesem Grund führte Arend Hintze während seiner Doktorarbeit eine EMS-Mutagenese durch, bei der nach potentiellen Zellfokussierungsmutanten gesucht wurde. Wie sich herausstellte, ergab dieser Ansatz einen Kandidaten. Diese Mutante wurde von Nadin Memar analysiert und kloniert (Dissertation Nadin Memar, 2012). Es handelt sich dabei um eine Mutation in dem Gen F52B12.1, dem Ortholog der Phosphomannomutase 2 in *C. elegans*. Die Zelllinienanalyse in Kombination mit Antikörperfärbungen zeigte, dass Zellen mit einem korrekten (Wildtyp-) Schicksal an eine falsche Position wandern. Die Wanderung geschieht zufällig und ist nicht gerichtet, d.h. verschiedene Embryonen des gleichen Mutantenstamms sehen in den Distanzkarten verschieden aus und weichen stärker voneinander ab, als von dem Wildtyp-Konsensus. Die Phosphomannomutase 2 ist ein hochkonserviertes Protein, das im Zuckerstoffwechsel die Umwandlung von Mannose-6-Phosphat in Mannose-1-Phosphat katalysiert. Mannose-1-Phosphat ist einer der elementaren Zuckerbausteine für Glykoproteine und -lipide (Freeze, H.H., 2009). Diese Mutante gibt damit einen Ausblick darauf, wie Zellpositionen und Zellidentitäten über Glykosilierungsmuster vermittelt werden könnten, da der „Zuckercode“ so viele Kombinationen zulässt, dass jede Zelle theoretisch ihren eigenen Code erhalten kann. Hingegen verwundert es, dass ein Protein, dass so früh in das Glykosilierungsmuster involviert ist, einen vergleichbar schwachen Phänotyp besitzt.

In dieser Arbeit sollte durch einen weiteren Mutagenese-Ansatz neue Zellfokussierungskandidaten isoliert und analysiert werden, um die Zellmigration in *C. elegans* besser verstehen zu können.

Ergebnisse

Einleitend wird in den Ergebnissen ein kurzer Überblick über den Ablauf und die Resultate der Mutagenese gegeben. Im Hauptteil der Arbeit werden zwei während der Mutagenese isolierten Mutanten (*t3205* und *t3206*) näher charakterisiert und das Problem der Zellmigration und Zellfokussierung in *C. elegans* untersucht.

Mutagenesen und Mutantenlesen

Schon 2006 verfolgte Arend Hintze (während seiner Doktorarbeit) den Ansatz durch eine Mutagenese und Mutantenlese interessante embryonal letale ts-Mutanten zu isolieren. Dazu verfolgte er unterschiedliche Ansätze, in der Hoffnung die Methode zu optimieren. Da Arend auch an Migrationsmutanten interessiert war, war ein besonders erfolgsversprechender Ansatz einen GFP-Reporter-Stamm (*mab-5::GFP*) zu mutagenisieren, der jedoch scheiterte. Grundlegend für alle Ansätze war jedoch, dass Hermaphroditen mit EMS mutagenisiert wurden. EMS verursacht hauptsächlich Punktmutationen in der DNA und ermöglicht die Isolierung von temperatur-sensitive (ts) Mutanten. ts-Mutationen haben den Vorteil, dass homozygote Mutanten lebensfähig sind und zu jedem beliebigen Zeitpunkt der Entwicklung das Genprodukt inaktiviert werden kann, z.B. um die maternale Funktion zu analysieren. Somit kann auch eine frühe embryonale Funktion aufgedeckt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch einen einfachen Wechsel der Temperatur, das Genprodukt an- bzw. abzuschalten ist. In diesem Fall eignen sich temperatur-sensitive Mutanten besonders, um die Funktion des Genprodukts zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung zu untersuchen. Allerdings konnte bei diesem Ansatz nur eine Mutante mit embryonalem Migrationsdefekt (Phosphomannomutase 2 F52B11.2 (*t3091*), Nadin Memar, Dissertation 2012) isoliert werden. Ein weiteres Problem dieses Ansatzes war, dass viele der isolierten Mutanten keinen 100% penetranten Phänotyp aufwiesen. Dies deutet entweder auf eine Kontrollfunktion des Gens innerhalb eines anderen Prozesses hin (Langenhan, T. et al., 2009), oder (wahrscheinlicher) auf eine Restaktivität des Gens.

Ein erster Versuch die Mutantenlese erneut zu optimieren scheiterte 2008. Der Grundgedanke war, die Ausbeute an strikten, monofunktionellen ts-Mutanten zu optimieren, indem nicht Hermaphroditen sondern Männchen mutagenisiert werden. Die mutagenisierten Männchen wurden dann direkt mit Wildtyp-Hermaphroditen rückgekreuzt, um so das Risiko zu mindern in der F₂-Generation synthetische Mutationen zu isolieren (d.h. der Phänotyp ist auf zwei Mutationen in unterschiedlichen Genen zurück zu führen). Auch der Ansatz in 384-Well-Platten scheiterte. Dies lag unter anderem daran, dass sich herausstellte, dass die vorher getesteten Bedingungen sich über einen Zeitraum von sechs Wochen als nicht praktikabel erwiesen. Nahezu alle isolierten Würmer starben, obwohl diese Bedingungen zuvor in einem Test über drei Wochen geprüft wurden. Hannes Grabner (externer Mitarbeiter des MPI-Dresden) versicherte im Voraus, dass eine Kultivierung in 384-Well-Platten schon erfolgreich durchgeführt wurde. Es ist allerdings unklar, ob dies mit mutagenisierten (gestressten) Würmern über einen ähnlich langen Zeitraum geschah. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass das benutzte Medium (M9 mit OP50) über einen so langen Zeitraum nicht genug Nährstoffe für den Wurm beinhaltet. Aus diesen Gründen führte ich (in Zusammenarbeit mit Katharina Luthe, Nadin Memar

Ergebnisse

und Sabrina Schiemann) erneut eine EMS-Mutagenese durch. Für die folgende Mutantenlese wurden die Auswahlkriterien strikter gefasst und ein größerer Ansatz gewählt, da nur ca. 0,1% der ts-Mutanten den gesuchten Migrationsdefekt aufweisen, wie die Mutagenese von Arend zeigte.

Ein Gedankenexperiment führte dazu, die Idee der Männchen-Mutagenese zu verwerfen. Ausgehend von 1.000.000 mutagenisierten F₂-Würmer, die jeweils (im Idealfall) eine individuell-unterschiedliche homozygote Mutation tragen, erwarteten wir (aus bisherigen Hermaphroditen-Mutagenesen) max. 1% ts-Mutationen, d.h. 1000 ts-Mutationen. Bei diesem Ansatz müssen mindestens 5000 Hermaphroditen (Genome) mutagenisiert werden. Dies beruht auf der Berechnung, dass ein Wurm ca. 200 Nachkommen produziert. Dies entspricht maximal 200 unterschiedlichen Mutanten. Es stellte sich dabei heraus, dass ein Teil (ca. 50%) der Mutationen synthetisch (nicht monoallelisch) ist (Arend Hintze, 2006). Überlegt man nun, dass durch ein vorheriges Auskreuzen die Wahrscheinlichkeit einer synthetischen Mutation um 50% verringert werden kann, ist die Idee des Auskreuzens gut. Das Problem dieses Ansatzes ist nun jedoch 5000 mutagenisierte, rückgekreuzte Männchen-Genome zu erhalten. Dazu müsste man theoretisch 1000 Kreuzungen ansetzen. Bei Kreuzungen mit *C. elegans* werden jeweils 5 Hermaphroditen mit 12-15 Männchen gekreuzt. Dies wiederum bedeutet, dass über 15.000 Männchen mutagenisiert werden müssen. Ein weiteres Problem ist, dass bei den Kreuzungen für Dresden klar wurde, dass nur geschätzt 50% der eingesetzten Hermaphroditen gekreuzt waren. Diese Faktoren führten dazu, dass eine Männchen-Mutagenese mit der gewünschten Ausbeute an Mutanten nicht durchführbar war.

Wie oben erwähnt, wurde angestrebt 1.000.000 Mutanten aus der F₂ zu vereinzeln und auf Temperatur-Sensitivität zu testen. Dieser Hochrechnung war jedoch zugrunde gelegen, dass das Projekt in 384-Well-Platten zu realisieren sei. Nach Problemen mit der Mutanten-Isolation in Dresden wurde jedoch in Braunschweig auf 96-well-Platten umgestellt, da hierzu Daten vorlagen, die eine erfolgreiche Durchführung versprachen.

In Anlehnung an die bisherigen Durchführungen und obengenannten Überlegungen, haben wir Hermaphroditen mutagenisiert und die F₂-Generation mit einem Wormsorter in Multi-Well-Platten vereinzelt. Diese Platten wurden klonal kopiert, sobald die F₃-Generation herangewachsen war. Eine Kopie wurde auf die restriktive Temperatur (25°C) gebracht, um ts-Mutanten zu identifizieren. Anschließend wurde auf die Ausgangsplatte bei der permissiven Temperatur (15°C) zurückgegriffen und alle ts-Kandidaten in neuen Multi-Well-Platten zusammengefasst (ein Kandidat pro Well). Diese Platten wurden auch kopiert und erneut auf ts getestet, da sich schon in Dresden herausstellte, dass der erste Test noch viele falsch-positive Kandidaten enthielt. Platzkapazitäten im 25°C-Inkubator machte es jedoch notwendig die Mutagenese zu staffeln. Hierdurch konnten weniger Würmer zeitgleich auf ts getestet werden. Dies führte dazu, dass isolierte Mutantenstämme auf NGM-Platten wachsen gelassen wurden, da durch die Ventilation im Inkubator das Flüssigmedium relativ schnell verdunstete. Diese Mutanten wurden ein drittes Mal ts auf Platten getestet. Dies lag daran, dass einige Mutanten eventuell nicht ts sondern extrem langsam entwickelnd waren, bzw. unter geringeren Stressbedingungen (z.B. Sauerstoffversorgung) nicht mehr ts waren.

Abschließend wurden von allen isolierten Kandidaten 4-D-mikroskopische Aufnahmen gemacht, da nur so ein embryonaler Migrationsdefekt untersucht werden kann. In diesem Schritt wurden alle sterilen Hermaphroditen, sowie Mutanten, die nur osmotisch sensitive

Ergebnisse

Embryonen und denaturierte Eier ablegen oder aus morphologischen Defekten nicht in der Lage waren Embryonen zu produzieren, aussortiert. Die 4-D-Aufnahmen wurden mit SIMI°Biocell analysiert. Hier stellte sich relativ früh heraus, dass eine komplette Zelllinien-Analyse für jeden in Frage kommenden Kandidaten nicht innerhalb des Zeitrahmens einer Doktorarbeit realisierbar war. Deshalb wurden zusammen mit Christian Hennig neue bioinformatische Methoden gesucht, um die Auswahl zu beschleunigen.

Insgesamt wurden vier Durchläufe gestartet (NC, ND, NE und NF). In dieser Arbeit werde ich im Besonderen den von mir ausgewerteten Teil (ND und anteilig NF) vorstellen. Im Weiteren zudem die aus der Datenbank (Konzept zusammen mit Katharina Luthe erstellt) resultierende Zahlen, die für die Auswertung der Mutagenese dienen (siehe Abschnitt „Auswertung der isolierten Mutanten“). Die Details zu den anderen Teilen der Mutagenese sind der Diplomarbeit von Sabrina Schiemann (2009), sowie den Dissertationen von Nadin Memar (2012) und Katharina Luthe (2012) zu entnehmen.

Zelllinienanalyse

Der von uns postulierte embryonale Migrationsdefekt hängt davon ab, dass Zellen sich an falsche Orte begeben, jedoch ihr normales Schicksal behalten (siehe Einleitung). Daher musste eine Methode gewählt werden, mit der dieser Defekt von Schicksalsmutationen zu unterscheiden ist. Dazu wurden mit dem Programm SIMI°Biocell Zelllinienanalysen aufgezeichnet, mit deren Hilfe man zwischen diesen beiden Fällen unterscheiden kann. Da dies jedoch eine aufwändige Methode ist, wurde eine Möglichkeit gesucht, Vorauswahlen treffen zu können, ohne jeweils alle 256 AB-Zellen des prämorphogenetischen Stadiums einer Mutante analysieren zu müssen. Diese Analyse musste dennoch spezifisch genug sein, um eine eventuelle Schicksalsmutation ausschließen zu können, bzw. den Fall, dass keine Zellen falsch migrieren. Dazu wurden zuerst nur die anterioren, mittleren und posterioren Nachkommen von ABala, ABalp, ABara, ABarp, ABpla, ABpra, ABpra und ABprp (32 Zellen) analysiert und mit Hilfe der Bioinformatik überprüft, ob diese im Vergleich zum Wildtypen korrekt liegen oder abweichen. War diese Analyse auffällig, wurden zunächst stichprobenartig Schicksale einzelner Zellen überprüft. Dazu wurde im speziellen das Zelltod-Muster analysiert und das Schicksal von Zelltypen, wie z.B. Hypodermis-Zellen oder der exkretorischen Zelle.

Wie sich im Nachhinein herausstellte, war diese Methode sehr fehlerbehaftet. Die Embryonen wurden so lange gedreht, bis die geringste Abweichung von dem Konsensus-Embryo erreicht wurde. Dies ist eine geeignete Methode um komplette Embryonen (256-AB-Zellen) in ihrer Position anzugleichen. Jedoch stellte sich bei der 32-Zell-Analyse heraus, dass durch die geringe Stichprobenzahl natürlich einzelne falschliegende Zellen, drastische Auswirkungen auf die Lage der anderen Zellen hatte. Dies führte dazu, dass Embryonen, die in der 32-Zell-Analyse eine enorme Falschlage der Zellen zeigten, sich in weiteren Analysen als normal erwiesen. Trotzdem konnten so diverse Mutanten aussortiert werden. Diese Methode verdeutlichte jedoch nochmals, dass für eine gute Charakterisierung des Phänotyps eine 256-AB-Zell-Analyse notwendig ist.

Auswertung der Mutagenese und Mutantenlese

Während der Mutantenlese wurden insgesamt 379.680 F₂-Hermaphroditen vereinzelt. Damit konnten 1669 Temperatur-sensitive Mutanten mit einem embryonal letalen Phänotypen isoliert werden. Diese wurden anschließend analysiert. Die Analyse der

Ergebnisse

einzelnen Stämme ist unterschiedlich umfassend, da einige Phänotypen nur eine grobe, „vorläufige“ phänotypische Einteilung zulassen (Tabelle 1 Abschnitt A1-5; Abb. 7A). Von allen 1081 Stämmen, die Embryonen produzierten (Tabelle 1 Abschnitt A6-9 und G4), wurde zunächst eine 4-D-mikroskopische Aufnahme gemacht und analysiert. Die einzelnen Analysen der 4-D-Aufnahmen unterscheiden sich in ihrer Tiefe, da mein besonderes Augenmerk auf Embryonen lag, die im prämorphogenetischen Stadium arretieren (199; Tabelle 1 Abschnitt G 4, unter anderem Abbildung 9 (B-L)). Diese Embryonen wurden einer Zelllinienanalyse (zuerst 32 Zellen und ggf. dann 256 Zellen) unterzogen, um mögliche Zellfokussierungskandidaten zu erkennen, die sich am wahrscheinlichsten in dieser Kategorie befinden. Die näheren Analysen von isolierten Zellfokussierungskandidaten, sowie einige Beispiele für Embryonen mit interessantem Schicksalstransformationen werden in folgenden Abschnitten beschrieben.

Tabelle 1: Auszug aus der Datenbank vom 28.09.2011.

Die Phänotypen sind in sieben große Kategorien eingeteilt. In A1-5 sind die Anzahl an Mutanten aufgelistet, deren Phänotyp bedingt, dass keine Embryonen produziert werden, bzw. diese nicht für Aufnahmen geeignet sind. Die weiteren Kategorien beziehen sich, geordnet nach Themen, auf: Cytoplasma-Morphologie (B), Zellbiologische Mutanten (C), Zelltod (D), frühe Gastrulationsdefekte (E) und fehlgebildete Gewebe (F). Als letzte Kategorie (G) sind die Zahlen zu allen Phänotypen aufgetragen, bei denen Zellfokussierungskandidaten erwartet werden, da hauptsächlich die Zellmigration betroffen ist. Abschließend sind die absoluten Zahlen zu den isolierten Stämmen, sowie den existierenden Aufnahmen und Analysen angegeben.

	Kategorien	Insgesamt	Diese Arbeit
A 1	Sterile Hermaphroditen	292	95
2	Adulte degeneriert <i>Morphologische Defekte verhindern, dass die Hermaphroditen eine funktionierende Vulva ausbilden können</i>	32	11
3	Hermaphroditen legen nur Oozyten ab <i>Die Hermaphroditen können die Oozyten nicht befruchten</i>	169	40
4	Osmotisch sensitive Eier <i>Die Embryonen platzen im deionisierten Wasser während der Präparation aus den Hermaphroditen</i>	64	29
5	Denaturiertes Cytoplasma <i>Die Embryonen sind befruchtet, jedoch noch im Hermaphroditen gestorben und zeigen nekrotisches Cytoplasma</i>	49	20
6	Entwicklungsarrest vor dem prämorphogenetischen Stadium <i>Die Embryonen sterben bevor sie das prämorphogenetische Stadium (256-AB-Stadium) erreichen</i>	153	57

Ergebnisse

7	Variabler Phänotyp <i>Die Embryonen eines Stammes sterben an stark abweichenden Zeitpunkten der Entwicklung (z.B. als 40-Zeller und während der Morphogenese)</i>	198	43
8	Brezel nicht lebensfähig <i>Die Embryonen erreichen das Brezel-Stadium ohne sichtbaren Defekt, jedoch sterben die Embryonen ohne geschlüpft zu sein</i>	223	74
9	Larval letal <i>Die Larven schlüpfen, sterben jedoch anhand z.B. morphologischer Defekte oder arretieren im Larvenstadium</i>	163	25
B 1	Abnormale Cytoplasma-Morphologie <i>Die Struktur des Cytoplasmas ist verändert, z.B. große Dottervesikel oder das Fehlen von Cytoplasma-Strukturen</i>	72	21
C 1	Defekte erste Zellteilung <i>Die Zygote teilt sich nicht, oder inkorrekt in z.B. 3 Zellen</i>	83	28
2	Polynukleäre Mehrzeller <i>Zellen im Embryo werden polynukleär oder zeigen mehrere Kernvesikel</i>	90	38
3	Spindel-Defekte <i>Die Spindeln werden nach einer Zellteilung nicht korrekt zurückgebildet oder die Anzahl ist nicht korrekt, z.B. 3 polige Spindeln</i>	86	11
4	Abberante Zytokinese <i>Die Zytokinese kann nicht korrekt abgeschlossen werden, die Teilungsfurche schließt nicht ab</i>	115	35
5	Asynchroner Zellzyklus <i>Zellen mit einem synchronen Zellzyklus (z.B. AB- Zellen) teilen sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten</i>	154	98
D 1	Abberanter Zelltod <i>Apoptotische Zellen werden nicht phagozytiert oder sind nicht korrekt reduziert</i>	121	27
E 1	Frühe Gastrulationsdefekte <i>Die E-Zellen migrieren nicht ins Innere des Embryos</i>	20	0
F 1	Abberante Keimbahnentwicklung <i>P-Zellen teilen sich symmetrisch statt asymmetrisch, bzw. fehlenden Zellteilungen in der P-Zelllinie</i>	51	20

Ergebnisse

2	Aberrantes Darm-Cluster/ keine Darmzellen <i>Im Embryo ist kein, oder ein abweichendes Darm-Cluster vorhanden</i>	43	19
3	Aberrantes Pharynx-Cluster <i>Im Embryo ist kein, oder ein abweichendes Pharynx-Cluster vorhanden</i>	59	15
4	Pharynx- und Darm-Cluster fehlplatziert <i>Die Cluster sind angelegt, befinden sich jedoch innerhalb des Embryos nicht an der korrekten Stelle</i>	62	15
5	Muskeldefekt <i>Der Embryo kontrahiert während der Elongation nicht, da entweder keine Muskeln angelegt wurden, oder diese defekt sind.</i>	51	9
G 1	Verformte Brezeln ("notches") <i>Embryonen erreichen das Brezel-Stadium, sterben dann jedoch aufgrund schwerwiegender morphologischer Defekte</i>	136	37
2	Aberrante hypodermale Schließung <i>Die Embryonen platzen während der Elongation auf, da die Haut an einigen Stellen nicht geschlossen ist, z.B. anterior am Kopf</i>	50	25
3	Schließung der ventralen Furche nicht abgeschlossen <i>Die Embryonen sterben zu Anfang der Morphogenese, da die hypodermalen Zellen sich ventral nicht schließen und durch Muskelkontraktionen der Embryo aufplatzt</i>	46	15
4	Entwicklungsarrest im prämorphogenetischen Stadium <i>Die Embryonen sterben zum Zeitpunkt der frühen Morphogenese, die Gewebe sind größtenteils differenziert (256-AB-Stadium), werden jedoch nicht korrekt angelegt</i>	199	63
5	Adhäsions-/Migrationsdefekte <i>Während der frühen Entwicklung entstehen innerhalb der Embryonen Hohlräume, was auf eine fehlerhafte Zelladhäsion oder -migration hinweisen könnte.</i>	131	18
	Anzahl der analysierten Stämme	1669	459
	Anzahl an 4-D-Aufnahmen unterschiedlicher Stämme	1081	265
	Anzahl an Zellanalysen zu 4-D-Aufnahmen	214	80*
	Gut charakterisierte Stämme <i>Mindestens eine 32-Zell-Analyse, Überprüfung des Zelltod-Musters sowie Zellschicksale einzelner Zellen (z.B. V6R (Hypodermis))</i>	155	58
	Anzahl der gut charakterisierten Stämme mit bioinformatischer Analyse <i>Mindestens eine 32-Zell-Analyse, Überprüfung des Zelltod-Musters sowie Zellschicksale einzelner Zellen (z.B. V6R (Hypodermis)), sowie die dazugehörige Bioinformatik</i>	60	28

Ergebnisse

	Schicksalstransformationen <i>Die Embryonen mit Entwicklungsarrest im prämorphogenetischen Stadium (siehe unter Punkt G 4) wurden analysiert und der Defekt konnte auf Schicksalstransformationen während der vorherigen Entwicklung zurückgeführt werden</i>	71	22
* von diesen 80 Stämmen wurden 5 nach dem ersten Mal Auskreuzen erneut näher untersucht			

Um die Daten der unterschiedlichsten Mutanten zu koordinieren und an einem Ort zusammenzufassen, wurde von Katharina Luthe und mir (unter Mitarbeit von Christian Hennig) eine Datenbank in Microsoft Access (Abbildung 10) erarbeitet. Diese Datenbank ist zugleich mit der Datenbank der 4-D-Aufnahmen verknüpft. Sie wurde so konzipiert, dass markante Punkte der Entwicklung, sowie die häufigsten auftretenden Phänotypen abgefragt werden und eine Zuordnung von „ok“, „nicht ok“, oder „?“ ausgewählt werden können. Ein Phänotyp, der die Entwicklung früh stört, lässt außerdem zu, dass Felder, die sich auf spätere Defekte beziehen, nicht ausgefüllt werden müssen. Das mehr Phänotypen als Stämme beschrieben werden, liegt an der Datenbankstruktur.

Ergebnisse

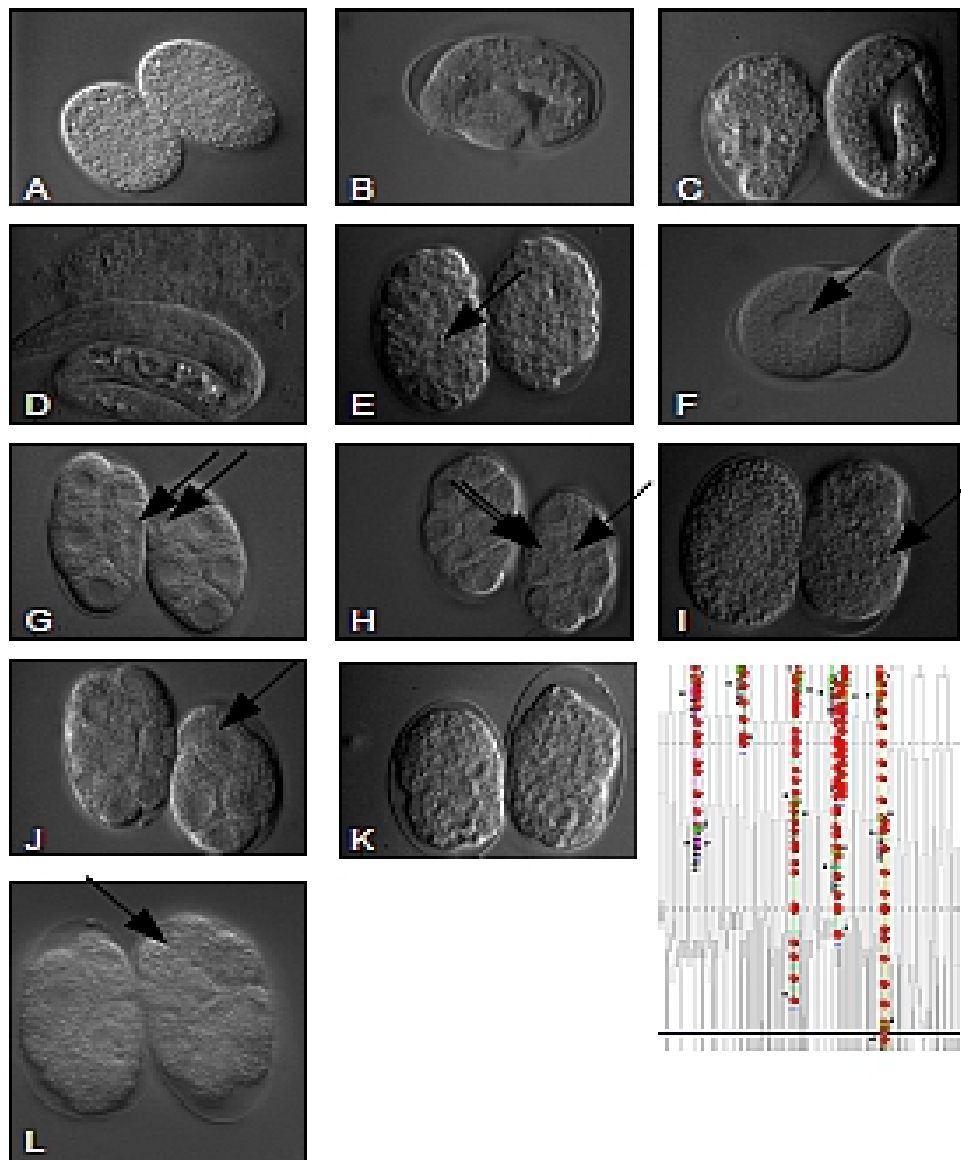


Abbildung 9: Exemplarische Darstellungen der Phänotyp-Kategorien aus Tabelle 2.

In (A) wurden denaturierte Embryonen fotografiert. Man erkennt, dass das Cytoplasma eine andere, „steife“ Struktur angenommen hat. In (B) hat sich der Wurm bis ins Brezel-Stadium entwickelt. Es sind deutliche Verformungen des Kopfbereiches zu sehen. (C) zeigt zwei Embryonen, wobei der linke Embryo in dem prämorphogenetischen Stadium arretiert ist, währenddessen der rechte Embryo als Brezel arretiert. Einige Mutanten schlüpfen, aber sterben dann kurze Zeit später als Larven (D). Des weiteren werden typische Defekte gezeigt wie: abnormale Dottervesikel im Cytoplasma (E, Tabelle B1), defekte 1. Zellteilung (F, Tabelle C1,) polynukleärer Mehrzeller (G, Tabelle C2), eine tripolare Spindel (H, Tabelle C3), Zelltod-Mutante mit nicht reduzierten Zellkörpern (I, Tabelle D1), Zytokinese-Defekt (J, Tabelle C4) mit einem asynchronen Zellzyklus (K, Tabelle C5) und eine defekte Keimbahn, bei der sich die P_2 -Zelle symmetrisch, statt asymmetrisch teilt (L, Tabelle F1).

Zu jedem eingetragenen Stamm wurde die 4-D-Aufnahme verfolgt. So wurden multiple Defekte für einzelne Stämme eingetragen. Zum anderen bedingen einige Phänotypen mehrere Kategorien. So wird ein Stamm mit einer fehlerhaften erste Zellteilung gleichzeitig in die Kategorie fallen „Entwicklungsarrest vor dem prämorphogenetischen Stadium“, auch „Asynchroner Zellzyklus“ und „fehlerhafte Zytokinese“ treten häufig zusammen auf.

Ergebnisse

Da sich die Datenbank aus losen Zusammenfassungen zu den Stämmen entwickelt hat, ist zudem noch ein Hyperlink zu den einzelnen Zusammenfassungen eingebunden worden. Hier können detaillierte Informationen abgerufen werden. Weitere Hyperlinks führen direkt zu den Zelllinienanalyse- und Bioinformatik-Dateien.

Eintrag_Mutagenese_ab2008

Stamm
ND_9_G2

Lineage

Lineage2

Lineage3

Bioinformatik

Zusammenfassung
\\RsMicro\Mutanten\Zusammenfassungen ND Anne\Zusammenfassung ND9G2.doc

Zellstadien

steril	osmotisch	Oocyten	krank nach shift	lisierte Eier
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Meiose erste Teilung nicht ok		Anzahl der Zellkerne ok	Spindeln ok	
Cytokine zellteilung nicht ok		Cytoplasma ok	Gastrulation ok	
asymetrische Zellteilung nicht ok		Entw bis z prä-m Stadium nicht ok	prä-m Stadium Bohne ok	
Darmcluster ok		Pharynxcluster ok	Hypodermis ok	
ventral enclosure ok		Muskelbewegung ok	Zelltod ok	
Zellzyklus nicht ok		ohne Beule ok	Pretzel ok	
Larve ok		Lage der Cluster i prä-m Stadium ok	ohne Hohlräume ok	
korrekte Schicksale ok		penetrant ok		

Datensatz: 1 von 1058

Abbildung 10: Datenbank-Oberfläche.

Die Datenbank wurde so angelegt, dass zuerst die Stammbezeichnung und anschließend per Hyperlink die dazugehörigen Zelllinien-Analysen und bioinformatische Auswertungen verlinkt werden können. Das Feld „Zusammenfassung“ wurde ursprünglich eingefügt, damit die losen Zusammenfassungen, aus denen die Datenbank entstand, auch per Hyperlink eingesehen werden können. Das Feld kann jedoch auch genutzt werden, eine kurze Übersicht über den Stamm direkt anzugeben. Das Feld „Zellstadien“ soll einen kurzen Überblick geben, wie viele Embryonen ab welchem Entwicklungsstadium aufgenommen wurden. Dies ist insofern wichtig, dass man bei einigen Aufnahmen, aufgrund des relativ späten Aufnahme-Beginns (4-12-Zeller), keinen früheren Defekt ausschließen kann. Die 5 Kästchen mit den Kategorien steril, ... schließen alle anderen Kategorien aus, da weder eine Aufnahme, oder Bioinformatik zu diesen Stämmen existieren kann.

Das Herzstück der Datenbank bilden die 23 Kategorien, mit denen die Mutanten beschrieben werden. Hier kann unterschieden werden, zwischen „ok“, „nicht ok“ und „?“. Außerdem können Felder frei gelassen werden, sollte ein früher Phänotyp („Entwicklung bis zum prämorphogenetischen Stadium“) andere Kategorien („prämorphogenetisches Stadium“) ausschließen. Dies erlaubt, dass eine Mutante in mehreren Kategorien aufgelistet wird, jedoch auch über Abfragen sehr detaillierte Phänotypen aufgelistet werden können (z.B. Pharynx-Cluster und Hypodermis defekt).

Ergebnisse

Nimmt man alle Zahlen zusammen, kann für diese Mutantenlese errechnet werden, dass wir eine Ausbeute von 0,4% strikten ts-Mutanten haben. Dies bezieht sich auf 379.680 vereinzelte F₂-Hermaphroditen und 1669 isolierte ts-Stämme (Tabelle 1). Von diesen 1669 Stämmen zeigten 199 Mutanten den von uns explizit gesuchten Phänotyp „Entwicklungsarrest im prämorphogenetischen Stadium“. Dies entspricht 0,05% der vereinzelter F₂-Würmer und 11,9% der isolierten Mutanten. Von diesen 199 Mutanten waren zwei mögliche Zellfokussierungskandidaten (*t3206* und *t3219*). Diese wurde nach New York (AG Hobert) zum *Whole Genome Sequencing* geschickt. Diese zwei Stämme entsprechen 1% von 199 Kandidaten, bzw. 0,1% der 1669 isolierten Mutanten. Vergleicht man diese Werte mit denen unserer Hochrechnung (ausgehend von der Mutagenese 2006), so entsprechen diese den Erwartungen. Durch das strikere ts-Auswahlkriterium wurde die Ausbeute deutlich verringert (1% → 0,4%). Jedoch sind ca. 1% der Mutanten, die einen Entwicklungsarrest im prämorphogenetischen Stadium zeigen, Zellfokussierungskandidaten. Da es durch die Versuchsumstellung nicht mehr praktikabel war, die angestrebten 1.000.000 F₂-Würmer zu vereinzeln, ist die absolute Ausbeute an isolierten Mutanten dementsprechend geringer.

Vier Beispiele für Schicksalsmutationen

Da in dieser Arbeit sicher nicht alle „interessanten“ Phänotypen beschrieben werden können, will ich mich auf vier Mutanten beschränken. Als ein erstes Auswahlkriterium für potentielle Zellfokussierungskandidaten wurde der sogenannte „Rührei“-Phänotyp gewählt. Hierbei entwickeln sich Embryonen bis ins prämorphogenetische Stadium und sterben ohne mit der Morphogenese/Elongation begonnen zu haben, bzw. scheitert dies gründlich, da die Gewebe zwar differenziert sind, jedoch nicht korrekt angelegt werden. 99% der Mutanten haben vermutlich eine oder mehrere Schicksalstransformationen, weshalb der Embryo sich nicht weiterentwickeln kann. Es werden z.B. zu wenige Muskelzellen gebildet, dafür jedoch zuviel Hypodermis-Zellen. Ein großer Anteil dieser Mutanten ist relativ einfach auszusortieren. Z.B. Zelltod-Mutanten, bei denen apoptotische Zellen nicht korrekt reduziert und phagozytiert werden. Auch auf der Anzahl der Zelltode beruhend sind viele Mutanten schnell als keine Zellfokussierungsmutante auszusortieren, da keine oder zu viel Zelltode auftreten. Trotz der Suche nach Zellfokussierungsmutanten wurden jedoch auch einige andere Mutanten genauer untersucht, da der Fokus dieser Arbeit auf der Entstehung und Aufrechterhaltung von Mustern beruht und diese Mutanten auch dazu beitragen können (Bischoff, M. und Schnabel, R., 2006).

Ergebnisse

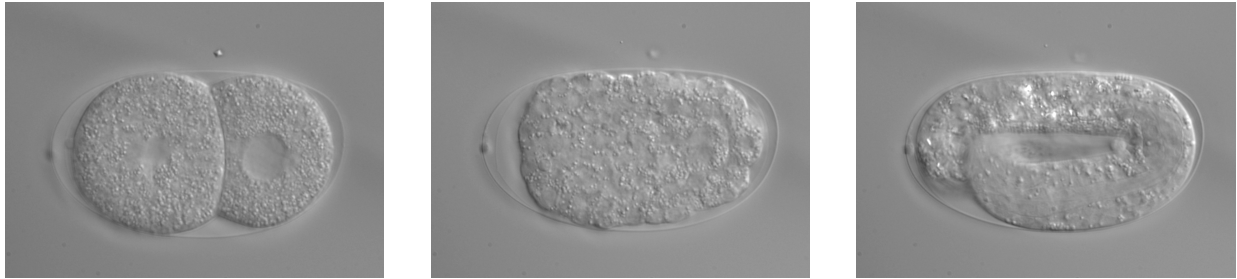


Abbildung 11: Übersicht der Entwicklung von *C. elegans*.

Das linke Bild zeigt einen 2-Zeller zu Beginn der Aufnahme. Die Kernhülle in der AB-Zelle hat sich aufgelöst, die Zelle wird sich kurze Zeit später teilen. In der Mitte ist das prämorphogenetische Stadium (256-AB-Zellen) abgebildet. Dieser Ausschnitt ist eine mittlere Ebene, sodass man sehr gut das Darm-Cluster erkennen kann. Im rechten Bild ist die Embryogenese von dem Wurm abgeschlossen (Brezel-Stadium) und er muss nur noch schlüpfen.

ND_20_G7 bzw. *apx-1(t3208)*: Ist APX-1 der einzige GLP-1-Ligand im 12-Zellstadium?

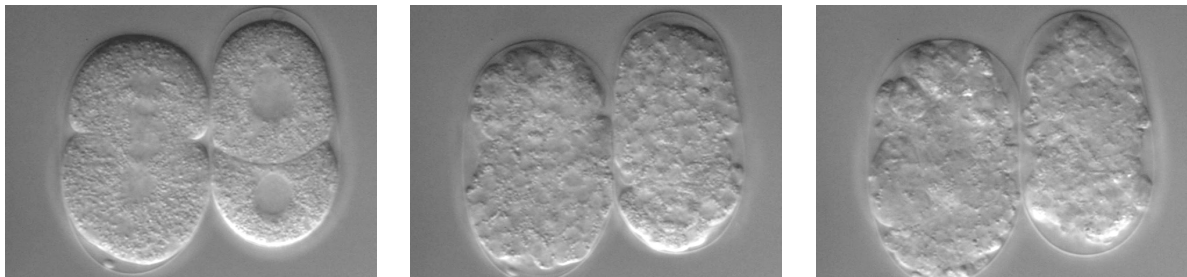


Abbildung 12: Die Entwicklung von *apx-1(t3208)*.

Die frühe Entwicklung entspricht der des Wildtyps (siehe 2-Zeller, links). Im prämorphogenetischen Stadium sieht man, dass besonders posterior relativ große Zellen den Embryo umgeben, dies sind Zellen aus der C-, D- und MS-Zelllinie. Auch an den Seiten der Embryonen sind Löcher zu erkennen, die zeigen, dass die Hypodermis-Zellen den Embryo nicht umschließen. Der terminale Phänotyp zeigt zwar Gewebestrukturen wie die Darm- und Pharynx-Cluster, jedoch sind diese fehlplatziert und das Pharynx-Cluster erscheint zu groß.

Diese Mutante fiel bei der 32-Zell-Analyse auf, da sich im prämorphogenetischen Stadium die normalerweise elongierenden Regionen anterior positionieren, wobei ABarp aber seine typische Y-Struktur relativ beibehält (Abbildung 13). Auch nach einmaligem Auskreuzen bleibt dieser starke Phänotyp erhalten. Eine Überprüfung des Zelltod-Musters (Tabelle A1, Anhang) zeigte Schicksalstransformationen in ABpla, ABpra, ABplp sowie ABprp an. Bei dieser Analyse fiel auch auf, dass Zelltode, die normalerweise in den posterioren Regionen in posterioren Zelllinienzweigen auftreten, in anteriorer Position auftraten (z.B. CD#12 ist kein Zelltod, allerdings die anteriore Schwesterzelle). Dies spricht stark für eine

Ergebnisse

posterior → anterior Transformation der betroffenen Region zu einem frühen Zeitpunkt in der Zelllinie. Um dieses besser untersuchen zu können und Fehler bei der Analyse zu vermeiden, wurde die Mutante bis ins prämorphogenetische Stadium komplett analysiert. Dadurch könnte man mittels einer Distanzkarte eventuelle Schicksalstransformationen aufdecken. Zu unserer großen Überraschung zeigte sich (sowohl in der 3-D-Repräsentation, wie auch in der Distanzkarte), dass es sich bei dieser Mutante höchst wahrscheinlich um ein Allel von *apx-1* (*apx-1* siehe Einleitung), oder ein anderes Mitglied des Notch/Delta-Signalwegs, handelt (Abbildung 14).

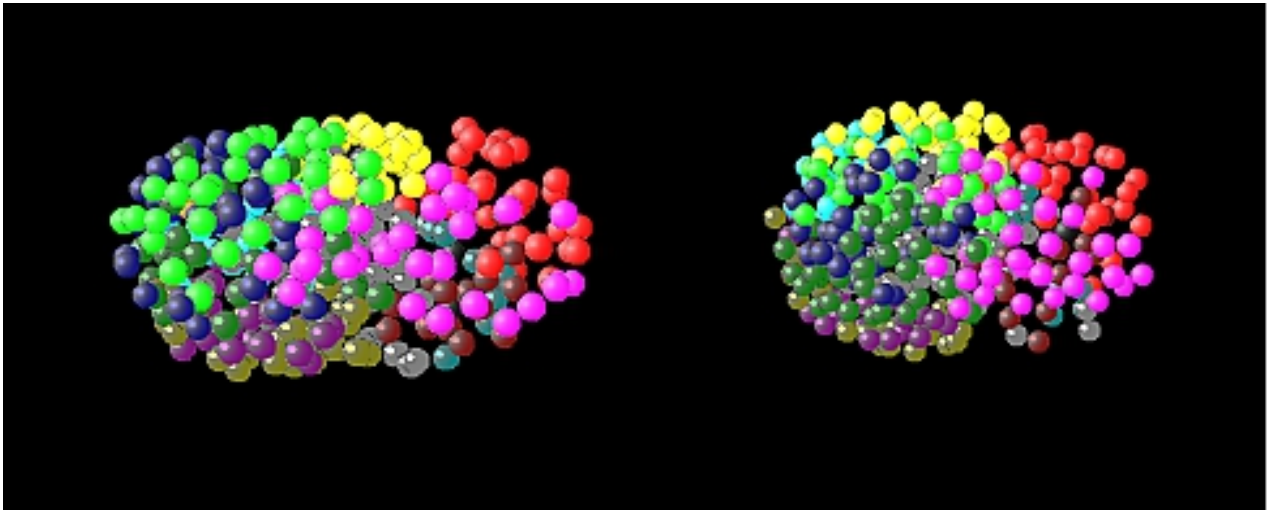


Abbildung 13: Vergleich der 3-D-Repräsentationen von *apx-1(t3208)* (links) und *apx-1(t2063)*.

Bei beiden Embryonen ist zu sehen, dass die einzige AB-Region, die sich noch über das Embryo streckt ABarp (pink) ist. Die anderen sieben AB-Regionen sammeln sich in der anterioren Hälfte des Embryos. Als Konsequenz liegen in der posterioren Hälfte des Embryos die mesodermalen Zellen aus den Regionen MS, C, D und E frei.

Vergleicht man die 3-D-Repräsentationen, so fällt sofort auf, dass sich bei *t3208* alle Regionen anterior sammeln, wohingegen ABarp noch in der Lage ist zu elongieren. Allerdings wird nicht die typische Y-Struktur der Region ausgebildet. Dies entspricht genau der 3-D-Repräsentation von dem schon stärksten bekannten Allel *apx-1(t2063)* (Abbildung 13). Erstaunlicher sind jedoch die Distanzkarten (Abbildung 14).

Ergebnisse

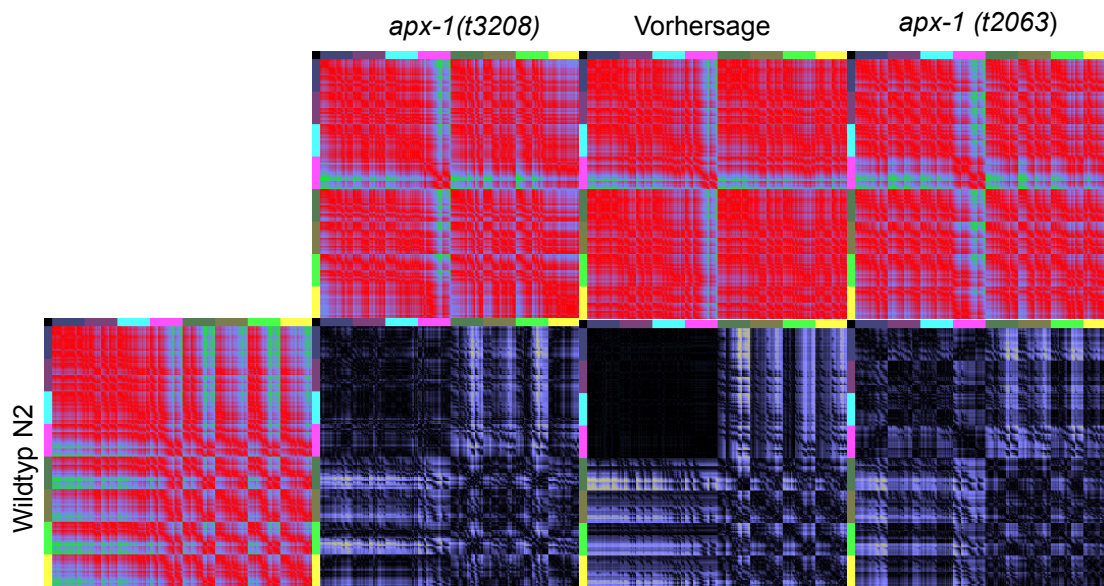


Abbildung 14: Vergleich der Distanzkarte von *t3208* mit einer bioinformatischen Vorhersage einer *apx-1*-Mutante (Schnabel, et al., 2006) und eines *apx-1(t2063)*-Allels untereinander und in den Differenzkarten zum Wildtyp N2. Vergleicht man die beiden Distanzkarten der Allele mit der Vorhersage, finden sich besonders im Vergleich der anterioren Regionen miteinander Abweichungen. Dies ist zu erwarten, da in der idealisierten Vorhersage Zellen dieselben Koordinaten haben können, was in den Original-Koordinaten der analysierten Allele nicht möglich ist und Zellen verdrängt werden, bzw. eine erhöhte Zelldichte im anterioren Bereich der Embryonen auftritt, was natürlich auch die Distanzen der anterioren Regionen beeinflusst.

In den Distanzkarten von *apx-1(t3208)* und *apx-1(t2063)* sieht man ein blaues Kreuz (Abbildung 14). Dieses wird durch die Region ABarp gebildet, da diese Region als einzige noch elongiert und somit größere Distanzen zu anderen Regionen hat. Im Gegensatz zu dem bekannten Allel *t2063* scheint bei *t3208* dieses Kreuz weniger diffus. Da für *apx-1* die Schicksalstransformationen bekannt sind, wurde zuvor schon eine bioinformatische Vorhersage für die Distanzkarte dieser Mutation erstellt. Vergleicht man nun die idealisierte Vorhersage (hier können zwei Zellen denselben Platz einnehmen!) mit der Distanzkarte von *apx-1(t2063)* und *t3208* ist augenscheinlich, dass *t3208* der Vorhersage mehr entspricht als das bekannt Allel. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde ein Komplementationstest von *t3208* mit *apx-1(t2063)* durchgeführt.

Tabelle 2: Ergebnisse der Komplementation nach der Inkubation der F_1 über Nacht bei 25°C. Erwartet waren bei einer Nicht-Komplementation 25% Nachkommen, die ts sind. Bei einer Komplementation würde der ts-Phänotyp nicht auftreten.

Anzahl Würmer	getesteter	Nicht ts	ts	% ts
39		27	12	30,8

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Komplementation (Tabelle 2) bestätigen genetisch, dass *t3208* ein neues Allel von *apx-1* ist. Die Sequenzierung ergab, dass es sich um eine Punktmutation handelt, die zu einem Aminosäuren-Austausch an der ersten Stelle nach dem Signalpeptid von APX-1 führt (pers. Kommunikation Hennig Schmidt). Ich vermute, dass dieser Austausch dazu führt, dass APX-1 bei der restriktiven Temperatur (25°C) nicht mehr korrekt prozessiert werden kann.

Ein weiterer Ansatz zur Bestätigung, dass es sich bei der Mutante um ein Allel von *apx-1* handelt, waren Antikörperfärbungen. Da von *apx-1(t2063)* bisher bekannt ist, dass die Anzahl von Muskel- und Pharynx-Zellen verändert wird, wurden Färbungen für diese Gewebe in *t3208* durchgeführt.

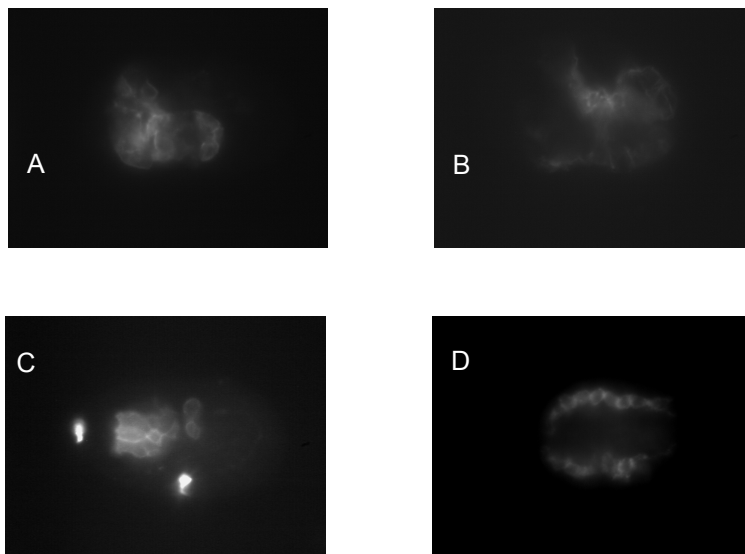


Abbildung 15: Antikörperfärbungen von *t3208*-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp.

Pharynx-Zellen gefärbt mit 3NB12 in ND_20_G7 (32 Zellen +/- 2,79) (A) und Wildtyp (21 Zellen) (C). Wie man erkennen kann, ist in der Mutante der Pharynx vergrößert. Auch die Muskelfärbung zeigt, dass ND_20_G7 (42 Zellen +/- 2,08) (B) im Vergleich zum Wildtyp (81 Zellen) (D) zu wenig Muskelzellen hat. $n=10$

Dies bedeutet, dass in Zukunft unterschiedliche Funktionen von *apx-1* während der Embryogenese, aber auch im Wurm besser untersucht werden können. Zuerst sollte das Allel jedoch besser charakterisiert werden.

Wie in der Einleitung schon beschrieben, wird diskutiert, ob APX-1 der Ligand aller frühen GLP-1 Induktionen im Wurm sein kann. Da diese Mutante den selben Phänotyp wie auch schon das *t2063*-Allel zeigt, bleibt die Frage offen, ob es sich um ein Null-Allel handelt und ein weiterer Ligand an GLP-1 bindet, oder auch diese Mutante eine Restaktivität besitzt. Um diese Frage zu klären, wurde ein *feeding*-RNAi gegen *apx-1* in *t3208* durchgeführt. Dieser lieferte erste Ergebnisse bei Antikörperfärbungen, dass durch Kombination des ts-Allels mit zusätzlichem RNAi bis zu 90% der Embryonen nur einen halb ausgebildeten Pharynx (14 statt 21 Pharynx-Muskel-Zellen) zeigen (persönliche Kommunikation Marius Klangwart und Ralf Schnabel). Dies entspricht dem *glp-1*-Phänotyp und unterstützt sehr stark die Hypothese, dass *t3208* ein hypomorphes *apx-1*-Allel ist und zudem APX-1 der einzige GLP-1-Ligand im 12-Zellstadium der Embryogenese von *C. elegans* ist. Damit ist *t3208* das einzig bekannte Allel, mit dem

Ergebnisse

dieser starke Phänotyp gezeigt werden konnte.

NC_1_G7 bzw. *t3207*: Eine neue Induktion in der frühen Embryogenese von *C. elegans*?

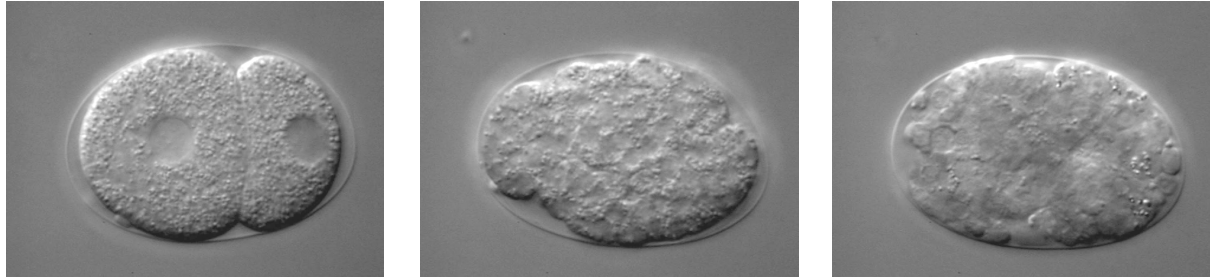


Abbildung 16: Die Entwicklung von NC_1_G7 (*t3207*).

Wie in Abbildung 9 sind hier der Aufnahme-Beginn als 2-Zeller (links), das prämorphogenetische Stadium (Mitte) und der terminale Phänotyp der Mutante *t3207* gezeigt. Das prämorphogenetische Stadium zeigt, dass die Zellen nicht an ihrer korrekten Position sind und den Embryo unförmig erscheinen lassen. Der terminale Phänotyp lässt erkennen, dass sich Gewebestrukturen wie der Darm gebildet haben, jedoch an falschen Orten, posterior außen liegt.

Nach einer Analyse von Sabrina Schiemann stellt sich heraus, dass in dieser Mutante Schicksalstransformationen vorliegen und der Pharynx zu klein ist. Allerdings wurde in dieser Analyse nur die „verkürzte“ bioinformatische Analyse durchgeführt, wobei nur 32 Zellen von 256 analysiert wurden (Sabrina Schiemann, Diplomarbeit 2009, vgl. Abschnitt Zelllinienanalyse). Nach einer erfolgreichen Komplementation mit *glp-1(e2144)* und einem fehlinterpretierten Komplementationstest mit *apx-1(t2063)* wurde beschlossen, dass diese Mutante das Potential hat, Aufschluss über die frühen Induktionen im Embryo zu geben. Um dies genauer zu untersuchen, kreuzte ich die Mutante zuerst zweimal aus, um ausschließen zu können, dass andere Hintergrundmutationen zu diesem starken Phänotyp beitragen.

Der Phänotyp bestätigte sich in den 4-D-mikroskopischen Aufnahmen. Als erstes wurde eine ausführliche bioinformatische Analyse durchgeführt. Hierbei war die Erwartung, sollte es sich um ein relativ starkes *apx-1* Allel handeln, dass in der Distanzkarte ein Muster auftritt, wie bei dem bekannten *apx-1*-Allelen *t3208* und *t2063*. Wie im oberen Abschnitt und in der Einleitung diskutiert, konnte mit diesen beiden Allelen nicht ausgeschlossen werden, dass APX-1 der einzige Ligand des Rezeptors GLP-1 in der frühen Entwicklung von *C. elegans* ist, oder ob keine Nullallele vorliegen. Sollten die bekannten Allele keine Nullallele sein, wäre die Erwartung, dass die Distanzkarten von *glp-1*- und *apx-1*-Nullallelen sich gleichen, da ihre Funktion bei der Induktion der Zellschicksale damit redundant wäre (Abbildungen 17 und 18).

Ergebnisse

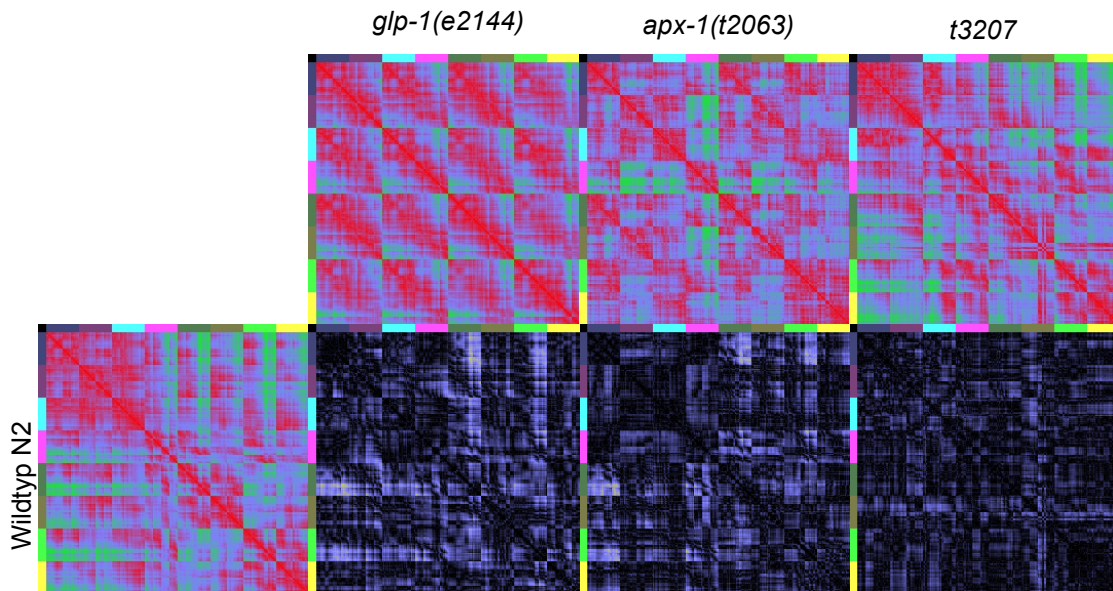


Abbildung 17: 3-D-Distanz- und Differenzkarten von *glp-1(e2144)*, *apx-1(t2063)* und *t3207* im direkten Vergleich gegen den Wildtyp.

Die oberen drei Distanzkarten zeigen *glp-1(e2144)*, *apx-1(t2063)* und *t3207*. Alle drei Distanzkarten zeigen unterschiedliche Muster, wobei *t3207* dem Wildtyp am meisten ähnelt. Dies wird durch die Differenzkarten, die die Differenz der einzelnen Mutanten zu dem Wildtyp wiedergeben, ergänzt. Während es bei *glp-1(e2144)* und *apx-1(t2063)* besonders im posterioren Bereich (z.B. ABpla) Übereinstimmungen gibt, die besonders in der Differenz deutlich werden, zeigt *t3207* Abweichungen in anderen Regionen (z.B. ABpra). Des weiteren ist die Differenzkarte von *t3207* wesentlich dunkler als die Differenzkarten von *glp-1(e2144)* und *apx-1(t2063)*.

Ergebnisse

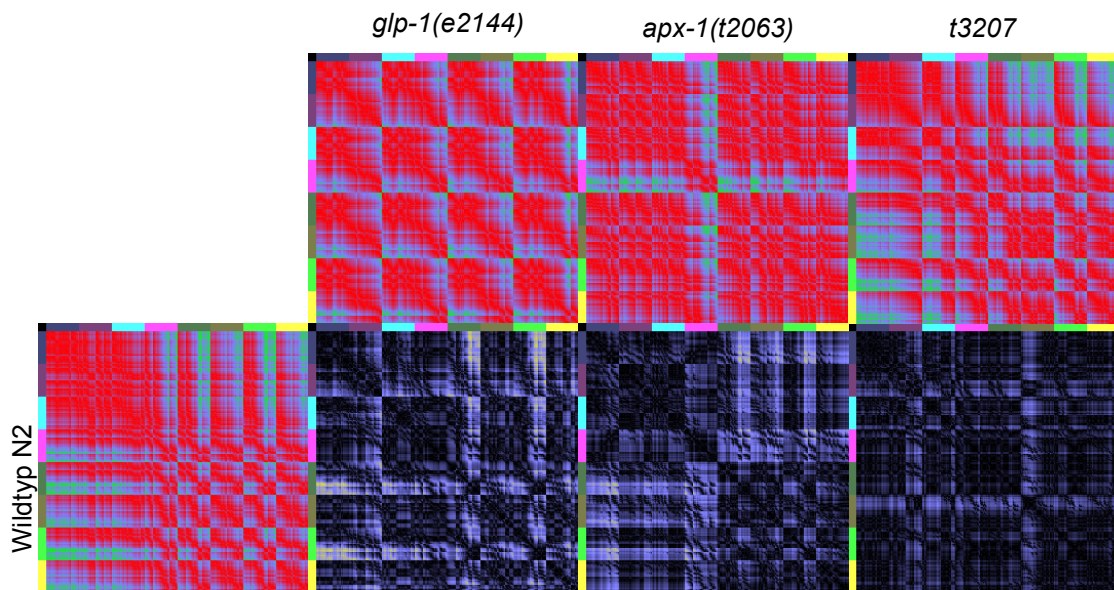


Abbildung 18: only-x-Distanz- und Differenzkarten von *glp-1(e2144)*, *apx-1(t2063)* und *t3207* im direkten Vergleich (von links nach rechts).

Wie in Abbildung 17 gezeigt, verstärken sich hier nochmal die Muster. Im Vergleich zu den 3-D-Karten kann man hier bei der Differenzkarte von Wildtyp und *t3207* sehen, dass in x-Richtung (a-p-Achse) besonders die Regionen ABalp und ABplp betroffen sind. Jedoch hebt sich auch hier die Differenzkarte deutlich von den Differenzkarten von *glp-1(e2144)* und *apx-1(t2063)* ab.

Es zeigte sich jedoch schon bei einer ersten Betrachtung der farblichen 3-D-Repräsentation, dass alle Regionen elongieren (Abbildung 19).

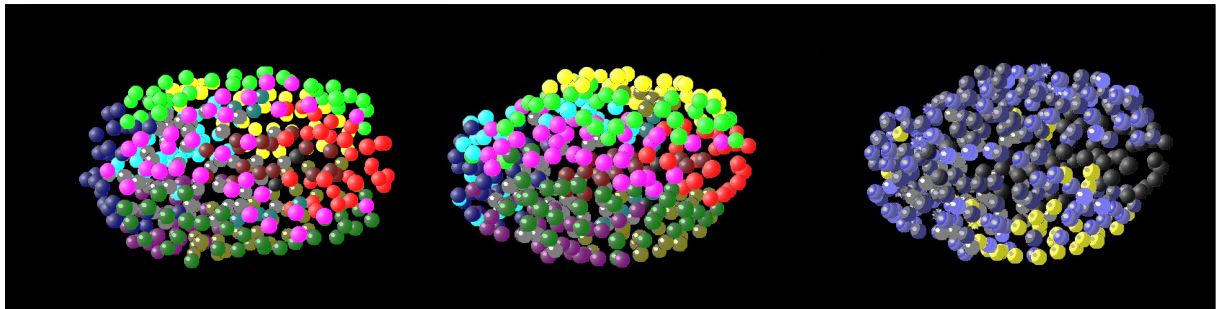


Abbildung 19: 3-D-Repräsentation des Wildtyps AWCH_N2_1, *t3207* und die berechnete Falschheit der Zellen in *t3207* im Vergleich zu diesem Wildtyp (von links nach rechts).

In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass im Vergleich zum Wildtyp die anterioren ABala- (dunkelblau), ABara- (hellblau) und ABalp-Regionen (lila) in *t3207* elongieren. Zudem ist die ABplp-Region (oliv) komplett falsch am posterioren Ende des Embryos lokalisiert, was in dem berechneten Falschheit-Embryo heraussteicht, da diese Region komplett gelb eingefärbt wird. Die einzigen Regionen, die einigermaßen korrekt zu liegen scheinen, sind die Regionen, die sich auch im Wildtyp über den Embryo strecken (ABarp, ABpla, ABpra und ABprp).

Dieser Phänotyp tritt weder bei *glp-1(e2144)* noch bei *apx-1(t2063)* auf und widerspricht der anterioren Ansammlung vieler Regionen in den beiden Mutanten. Um diesen Eindruck auch statistisch erfassen zu können, wurde zudem noch eine Distanzkarte erstellt und mit

Ergebnisse

den bekannten Karten von *glp-1(e2144)* und *apx-1(t2063)* verglichen. Wie sich herausstellte, weicht die Distanzkarte eindeutig von den bekannten Karten von *glp-1(e2144)*, bzw. *apx-1(t2063)* ab, da sie mehr der Wildtyp-Karte gleicht. Dies ist besonders in den Differenzkarten schön zu erkennen (Abbildungen 17 und 18). Da allerdings bei *t3207* genauso wie auch bei *glp-1(e2144)* und *apx-1(t2063)* das Muster eine drastische Verstärkung in der only-x-Differenzkarte (Abbildung 18) zeigt, wurden zusätzlich dazu weitere only-x-Distanzkarten erstellt. Jedoch zeigen diese Karten frühere Zeitpunkte der Entwicklung, um nachzuvollziehen, wann der Phänotyp beginnt sich auszuprägen. Dazu wurden das 128-AB-Zell- sowie das 64-AB-Zellstadium ausgewählt (Abbildung 20-22).

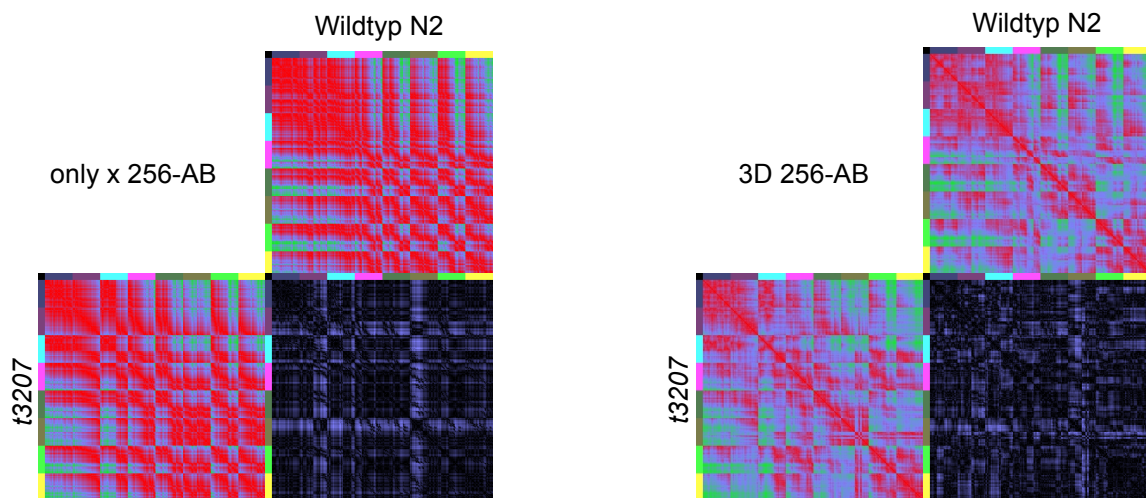


Abbildung 20: only x- und 3-D-Distanz- und Differenzkarten von *t3207* und dem Wildtyp im 256-AB-Stadium.

Beide Differenzkarten zeigen zwei Streifen. Zum einem in der posterioren ABalp-Region und in der anterioren ABpla-Region.

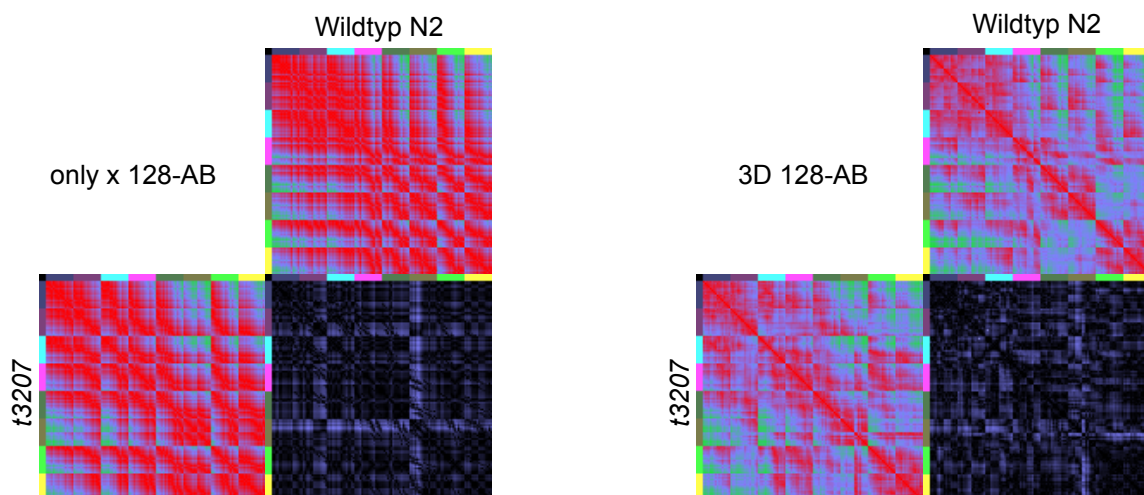


Abbildung 21: only x- und 3-D-Distanz- und Differenzkarten von *t3207* und dem Wildtyp im 128-AB-Zell-Stadium.

Ergebnisse

Die Karten sind vergleichbar zu denen im 256-AB-Zell-Stadium. Die beiden am stärksten Regionen sind auch eine Teilungsrunde (AB-Zellen) zuvor falsch positioniert.

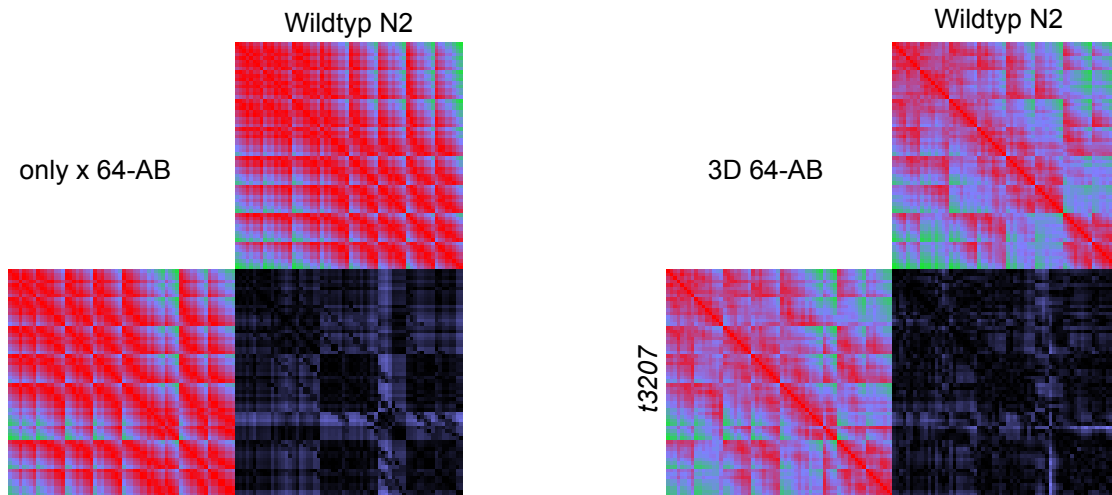


Abbildung 22: only x- und 3-D-Distanz- und Differenzkarten von *t3207* und dem Wildtyp im 64-AB-Zell Stadium.

Auch schon im 64-AB-Zell-Stadium treten die Muster aus dem 128- und 256-AB-Zell-Stadium auf, was auf einen sehr frühen Defekt hindeutet.

Wie man der Entwicklung des Musters entnehmen kann (Abbildungen 20 - 22) sind schon im 64-AB-Zellstadium die Regionen ABalp und ABpra betroffen. Dies lässt auf eine frühe Funktion von *t3207* schließen. Die Auswertung des Zelltod-Musters (Tabelle A2, Anhang) unterstützt zudem die Annahme, dass es sich bei dieser Mutante um eine Schicksalsmutation handelt. Jedoch sind weitere Analysen von Embryonen notwendig, um eine spezifischere Aussage über die Funktion, bzw. das möglicherweise betroffene Gen, treffen zu können. Diese Analyse deutet stark daraufhin, dass die Region ABalp in ihrem Schicksal verändert wurde, da beide für diese Region charakteristischen Zelltode fehlen (Tabelle A2, Anhang).

Um ausschließen zu können, dass *t3207* doch nicht ein hypomorphes Allel von *glp-1* (Chromosom III) oder *apx-1* ist, wurde diese Mutante auf ein Chromosom kartiert. Da *apx-1* auf Chromosom V liegt, war es interessant, ob *t3207* auch auf Chromosom V kartiert werden kann.

Ergebnisse

Tabelle 3: Auswertung der Kreuzung von MSI mit *t3207*.

Es wurden von jedem in der F₂-Generation vorkommenden homozygoten Marker jeweils 30, bzw. 40 Würmer vereinzelt und bei der restriktiven Temperatur (25°C) getestet, ob die Würmer zudem ts sind. Sind die beiden Mutationen nicht gekoppelt, entspricht das Segregationsmuster der 3. Mendelschen Regel und 25% der vereinzelt Würmer müssten ts sein. Weicht der Wert stark ab (<25%) sind die Gene gekoppelt und müssen auf dem selben Chromosom liegen. In diesem Fall liegt *t3207* auf dem X-Chromosom.

Sichtbarer Marker	Anzahl vereinzelter F ₂ -Nachkommen	Nicht Temperatur-sensitiv	Temperatur-sensitiv	% Temperatur-sensitiv
<i>unc-5(e53)^{IV}</i>	30	21	9	30
<i>dpy-11(e224)^V</i>	40	31	9	22,5
<i>lon-2(e678)^X</i>	30	29	1	3,3

Dies bedeutet für *t3207*, dass die Mutation auf dem X-Chromosom (relativ nah an *lon-2*) liegen muss (Tabelle 3). Somit schließt sich gleichzeitig die Möglichkeit aus, dass *t3207* ein Allel von *glp-1* oder *apx-1* sein könnte. Damit könnte diese Mutante ein Beispiel für einen weiteren Signalweg sein, der zu den frühen Induktionen in der AB-Zelllinie im Embryo beiträgt und vielleicht andere Muster definiert als bisher bekannt. Andererseits bleibt die Möglichkeit bestehen, dass es sich um ein weiteres Gen innerhalb des *glp-1/apx-1*-Signalwegs handelt. Die Elongation von ABalp spricht für eine Transformation in eine posteriore Region, bzw. für eine Teiltransformation der Region ABalp. Da die Region ABala nicht betroffen zu sein scheint, sollten somit die Grundsicksale ABa und ABal nicht verändert worden sein. Sollte sich eine dieser Vermutungen bestätigen lassen, könnte diese Mutante unter anderem auch ein weiterer Schalter bei der binären Spezifikation (Kaletta, T., Schnabel, H. und Schnabel R., 1997) sein, oder ein weiterer Faktor bei der Induktion der acht AB-Grundsicksale.

NC_22_G10: Kann im prämorphogenetischen Stadium nur eine AB-Region transformiert sein?



Abbildung 23: Die Entwicklung von NC_22_G10.

Die Entwicklung von der Zygote bis ins prämorphogenetische Stadium unterscheidet sich in NC_22_G10

Ergebnisse

nicht signifikant von der des Wildtyps. Während der Morphogenese und Elongation des Embryos zeigt die Hypodermis Löcher und durch den entstehenden Druck der Muskelkontraktionen platzen die Embryonen an unterschiedlichen Stellen auf. Der linke Embryo platzt ventral, während der rechte Embryo anterior am Kopf aufplatzt.

Auch diese Mutante wurde zu Anfang mit Hilfe von Sabrina Schiemann isoliert und aufgenommen. Da Sabrina im Rahmen ihrer Diplomarbeit jedoch nicht alle interessanten Mutanten aus dem Screen NC analysieren konnte, habe ich die verbliebenen Aufnahmen durchgeschaut und potentiell interessante Aufnahmen weiter analysiert.

Diese Mutante zeigte bei einer oberflächlichen Analyse (32 von 256 Zellen), dass fünf Zellen falsch lagen. Von den Zelltoden waren viele, jedoch nicht alle korrekt. Darauf aufbauend, wurde NC_22_G10 als potentielle Schicksalsmutante gegen den Wildtyp ausgekreuzt. Wie sich herausstellte, änderte sich der Phänotyp nach dem Auskreuzen. Dies lässt auf diverse Mutationen im genetischen Hintergrund schließen, die mit dem Auskreuzen beseitigt werden sollten. Die Mutation war jedoch immer noch embryonal letal. Eine Analyse der Aufnahme zeigte zunächst, dass der Phänotyp sich dahingehend geändert hatte, dass die Embryonen nun sowohl mit der Morphogenese wie auch mit der Elongation beginnen. Jedoch platzen sie währenddessen aufgrund eines Problems mit der Hypodermis auf und sterben. Dieser Phänotyp tritt relativ häufig auf und kann vielfältige Ursachen haben. Meistens sind die Hypodermis-Zellen schicksalstransformiert und die Haut kann sich nicht um dem Embryo schließen. Beginnt sich zur Elongation Druck innerhalb des Embryos aufzubauen, platzt der Embryo, da kein Gegendruck durch die Haut gegeben ist. Bei einer näheren Betrachtung des prämorphogenetischen Stadiums fiel auf, dass sich an den Seiten des Embryos relativ mittig ein paar Zellen sammeln. Hierdurch entstehen links und rechts zwei kleine „Knubbel“. Diese Beobachtung unterstützte die Idee, dass die Hypodermis betroffen sein könnte, da dies die Region des Embryos ist, wo die ABpra- und ABpla-Regionen elongieren und die Hypodermis-Vorläufer (z.B. *hyp 4*) liegen. Um genauer entscheiden zu können, welche Zellen betroffen sind, wurde auch für diese Mutante eine komplette Zelllinien-Analyse erarbeitet. Es war auch unklar, ob Schicksalstransformationen in diesen Regionen der Zelllinie vorkommen, oder hier ein ausschließlich später Migrationsdefekt vorlag.

Die 3-D-Repräsentation und die Distanzkarte zu dem prämorphogenetischen Stadium zeigen, dass der Embryo im Vergleich zum Konsensus-Wildtyp nahezu keine Abweichungen zeigt (Abbildungen 24 und 25).

Ergebnisse

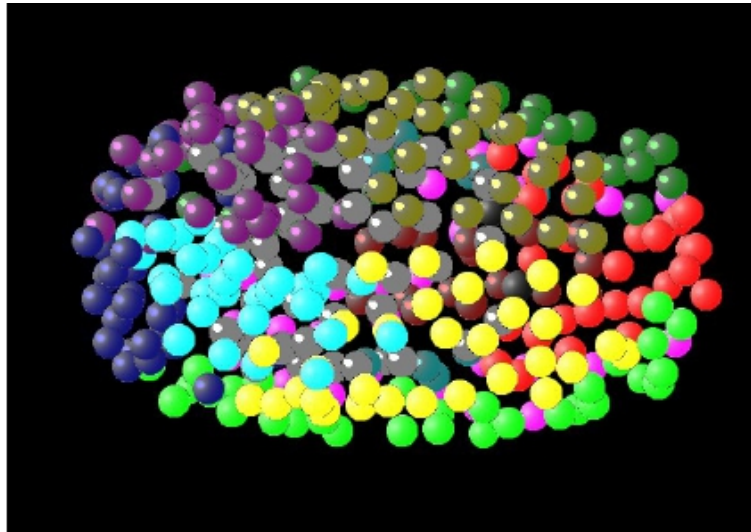


Abbildung 24: 3-D-Repräsentation von NC_22_G10.

In dieser Abbildung wird die ventrale Aufsicht auf den Embryo dargestellt. Wie man sehen kann, umschließen die Zellen aus den Regionen ABara (hellblau), ABalp (lila), ABplp (oliv) und ABprp (gelb) den Embryo. Dies bedeutet, dass die ventrale Schließung nicht defekt ist und das Aufplatzen der Embryonen zu dem späteren Zeitpunkt ein anderes Problem der Hypodermis-Zellen ist.

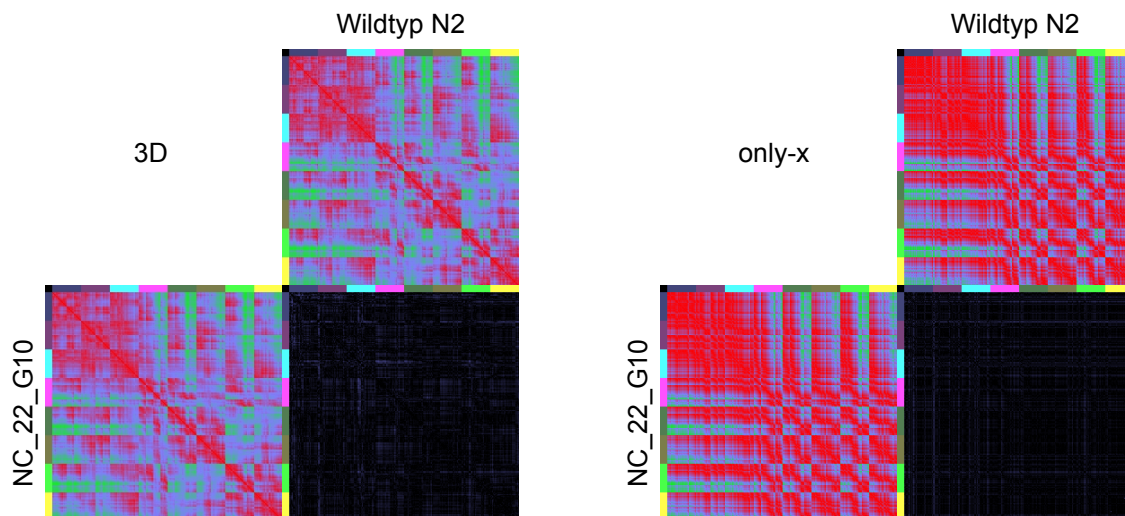


Abbildung 25: only x- und 3-D-Distanz- und Differenzkarten von NC_22_G10 gegen den Wildtypen.

Wie auch schon das 3-D-Repräsentation (Abbildung 24) zeigt, sieht die Distanzkarte von NC_22_G10 wie die des Wildtyps aus. Bildet man die Differenzkarte aus den beiden Distanzkarten, zeigen sich kaum Abweichungen. Vgl. Differenzkarte zweier Wildtypen gegeneinander (Einleitung Abbildung 8)

Dies überrascht nicht, da (wie schon beschrieben) wahrscheinlich nur zwei bis vier Zellen etwas deplatziert sind. Um eine Falschlage von Zellen in einem Embryo anzuzeigen, wurde als Schwellwert in der Bioinformatik die zweifache Standardabweichung innerhalb der Wildtyp-Embryonen festgelegt (pers. Kommunikation Christian Hennig). Sollten die Zellen nur etwas von ihrer normalen Lage abweichen, wird dies wahrscheinlich im Rauschen der bioinformatischen Methode untergehen. Eine weitere Erklärung wäre, dass

Ergebnisse

der Defekt sich erst nach dem prämorphogenetischen Stadium signifikant ausprägt. Diese Frage ist jedoch nicht zu klären, da durch Bewegungen der Embryonen und unterschiedlicher Zellteilungszeiten in der nächsten Zellteilungsrunde der AB-Zellen eine weiterführende Bioinformatik nicht möglich ist. Auch das Zelltod-Muster unterstützt zu diesem Zeitpunkt, dass keine frühen Schicksalstransformationen vorliegen, da alle 14 Zelltode an der korrekten Position auftreten.

Aus diesem Grund wurde der Embryo über das 256-AB-Zell-Stadium hinaus analysiert (soweit es möglich war). Besonders die Hypodermis, die ihren Ursprung in den Regionen ABpla und ABpra hat, wurde genauer untersucht (Tabelle 4). Dies führte zu der Beobachtung, dass in der ABpla-Region keine Hinweise darauf gefunden werden konnten, dass Zellen dieser Region ein verändertes Schicksal hätten. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Region ABpra, dass vermeintliche Hypodermis-Zellen eine zusätzliche Teilung einfügen. Dies bedeutet, dass die Hypodermis-Zellen ein anderes Schicksal angenommen haben.

Tabelle 4: Analyse der Hypodermis-Zellen in NC_22_G10 nach dem prämorphogenetischen Stadium.

In der Tabelle ist zuerst die Region, die der Zelle angehört, angegeben. In der zweiten Spalte ist die Zelle benannt und in der letzten Spalte, ob die Zelle ihr korrektes Zellschicksal hat.

Region	Zelle	Schicksal
ABpla		+
ABpra	P3/4R	Transformiert
ABpra	P1/2R	Transformiert

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in dem Embryo wahrscheinlich nur eine Region transformiert ist. Da es bisher noch kein Beispiel für eine Mutation gibt, die nur eine Region beeinflusst, ist dies für die Zukunft weiterhin interessant. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass der Phänotyp sich erst relativ spät ausprägt. Eine einfache Möglichkeit, diese Ergebnisse zu überprüfen/unterstützen, wäre eine gewebespezifische Antikörperfärbung.

ND_15_B4: Wird ABala als Grundschicksal aller AB-Blastomere induziert?



Abbildung 26: Die Entwicklung von ND_15_B4.

Im prämorphogenetischen Stadium von ND_15_B4 sind die Embryonen deformiert. Man kann sowohl außer- wie innerhalb der Embryonen Löcher erkennen. Im terminalen Phänotyp kann man zwar

Ergebnisse

gewebespezifische Zellen wie die Darmzellen erkenne, jedoch sind Strukturen nur rudimentär oder gar nicht zu erkennen.

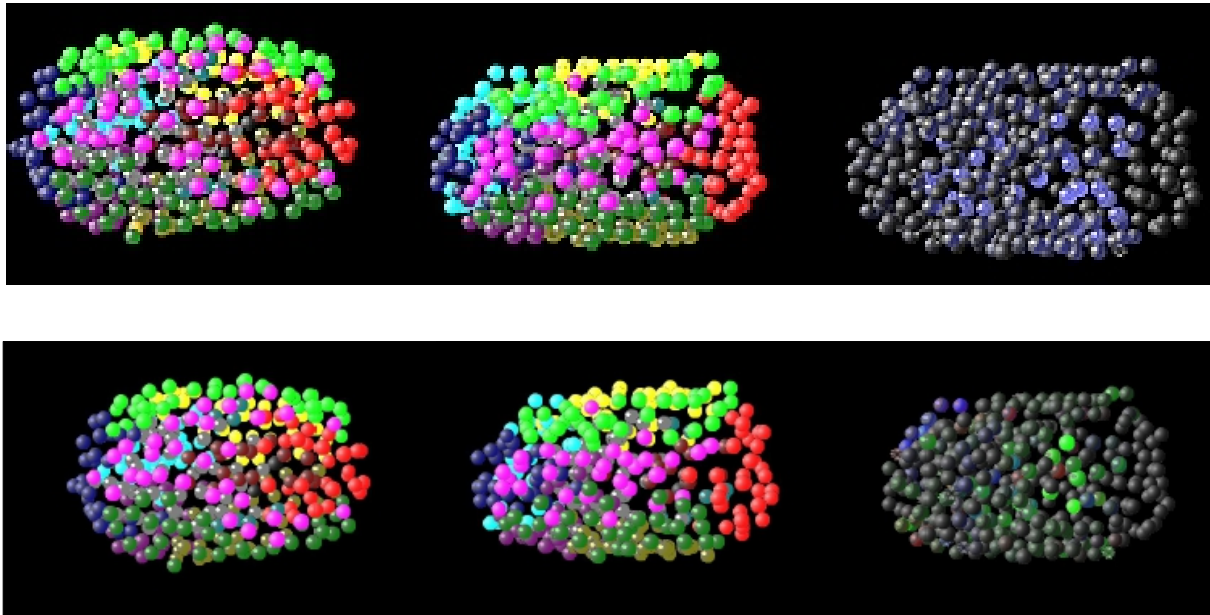


Abbildung 27: 3-D-Repräsentationen (alte Methode (oben) und vektoriell (unten)) vom Wildtyp-Embryo, ND_15_B4 und die Falschlage der Zellen im Embryo von ND_15_B4 im Vergleich gegen den Wildtyp (von links nach rechts).

Am auffälligsten in der 3-D-Repräsentation von ND_15_B4 ist, verglichen mit dem Wildtypen, dass die ABarp-Region (pink) nicht ihre typische Y-Struktur bildet. Des weiteren ist im Hintergrund zu erkennen, dass auch die Region ABara (hellblau) sich anterior verschoben hat. In der Falschlage der Zellen sind auch diese Zellen eingefärbt. Allerdings zeigt sich bei der neuen Methode, dass auch Zellen der Abala-Region eingefärbt werden.

Bei dieser Mutante wurde bisher nur die Grundcharakterisierung durchgeführt. Wie man aus der bioinformatischen Analyse erkennen kann, gibt es leichte Abweichungen in den Regionen ABara und ABarp (Abbildungen 27 und 28).

Ergebnisse

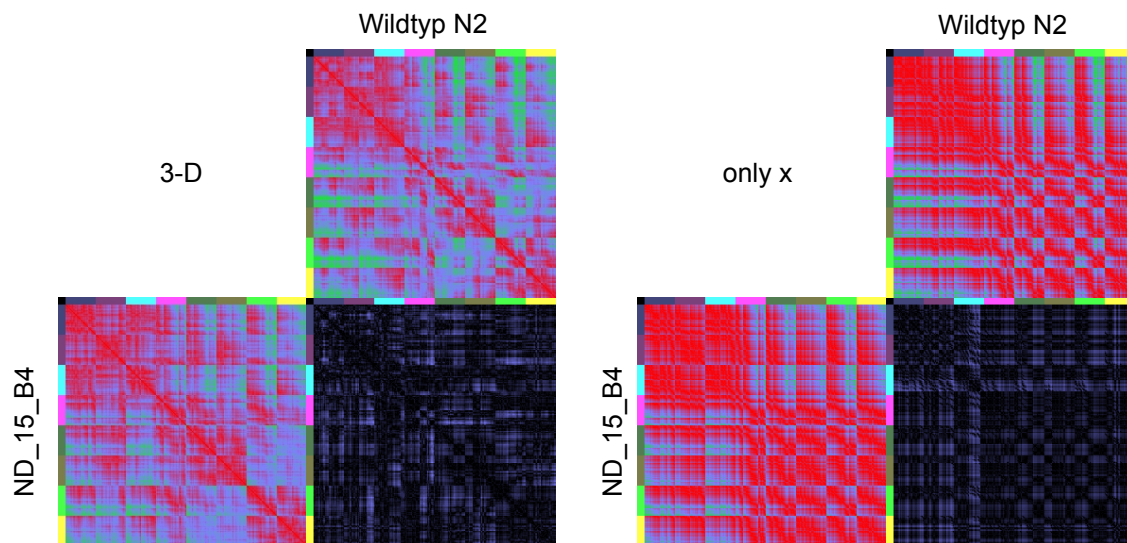


Abbildung 28: 3-D- und only x-Distanz- und Differenzkarten von ND_15_B4 im Vergleich zum Wildtyp-Konsensus.

Die 3-D-Distanzkarte der Mutante ähnelt der Karte des Wildtyps, sie ist nur ein bisschen verschwommen. In der Differenzkarte ist keine Region im Besonderen eingefärbt. Dies bedeutet, dass mehr oder weniger alle Zellen eine etwas andere Distanz zu einander haben als im Wildtyp. Im Gegensatz dazu zeigt die only x-Differenzkarte, dass besonders die posterioren Zellen der ABara-Region auf der a-p-Achse fehlplatziert sein müssen.

Interessanterweise widersprechen diese Ergebnisse der Analyse des Zelltod-Musters. Während der Analyse des Zelltod-Musters (Tabelle A3, Anhang) fiel mir auf, dass das Zelltod-Muster in der Region ABala verändert ist und die ABara- und ABarp-Regionen ein normales Schicksal haben sollten. Dies würde darauf hindeuten, dass die ABara- und ABarp-Regionen entweder durch andere Regionen fehlplatziert werden, oder die Regionen fehl migrieren. Da in dieser Mutante definitiv Schicksalstransformationen stattfinden, kann man jedoch zwischen diesen beiden Fällen nicht unterscheiden, ohne mehrere Embryonen untersucht zu haben.

Sollten sich die Daten bestätigen lassen (Zelllinien-Analysen weiterer Embryonen), ist diese Mutante ein hervorragender Kandidat für eine Schicksalstransformation in ABala. Dies ist besonders interessant, da ABala das Grundschicksal aller AB abgeleiteten Blastomeren ist und ABala somit die einzige Blastomere ist, die während des 12-Zell-Stadiums nicht induziert wird. Natürlich können diese Schicksalstransformationen auch erst später auftreten. Allerdings ist bisher noch nicht beobachtet worden, dass Zellen der Region ABala in ihrem Grundschicksal betroffen sind, während andere normal sind. Die Spezifizierung des AB-Grundschicksals (ABala) ist unbekannt. Es ist somit auch unbekannt, ob es überhaupt induziert wird. Sollte es als Grundschicksal nicht induziert werden, ist diese Mutante umso interessanter, da sie zeigen würde, dass ABala trotzdem das Potential besitzt induziert zu werden. In beiden Fällen (ABala wird induziert/nicht induziert) bedeutet diese Ergebnis, dass die frühe Embryogenese von *C. elegans* noch nicht abschließend verstanden ist.

Zudem zeigt die Analyse dieses Embryos eine fundamentale Schwäche der Bioinformatik auf. Die am stärksten betroffene Region ABala wird in den Distanz- und Differenzkarten

Ergebnisse

kaum gefärbt. Auch in den 3-D-Repräsentationen, die eine Falschlage der Zellen zeigen, sind andere Regionen stärker betroffen. Dies liegt daran, dass die Zellen von ABala immer eine Region an der Spitze des Embryos formen. Sind nun einige Zellen innerhalb dieser Region falsch platziert, sind die Abweichungen in den Distanzen so gering, dass es in der Bioinformatik nicht auffällt. Andererseits werden gestreckte Regionen und die Region ABarp mit ihrer Y-Struktur häufig überbewertet. So kann die Region ABarp ihr korrektes Schicksal besitzen, jedoch durch eine Mutation in anderen Regionen verhindert werden, so dass sich die Y-Struktur komplett bilden kann. In solchen Fällen (auch hier) wird diese Region fast immer eingefärbt. Dies zeigt unter anderem das Problem, dass bei der Bioinformatik immer alle Zellen einbezogen werden müssen, um alle anderen Zellen in ihrer Lage zu beurteilen. Somit wird auch mit Hilfe der falsch liegenden Zellen die Position von richtig liegenden Zellen beurteilt. Das bedingt, dass durch jede falsch liegende Zelle alle anderen Zellen auch ein bisschen falsch liegen. Liegen zu viele Zellen falsch, führt es dazu, dass man keine Aussage mehr über die Falschlage aller Zellen treffen kann. Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass es in dem Embryo keinen internen Fixpunkt gibt von dem ausgehend man die absoluten Positionen der Zellen bestimmen kann.

Um das Problem der Überbewertung der Zellen in x-Richtung (da sie die längste Achse im Embryo ist) in der 3-D-Repräsentation zu kompensieren, hat Christian Hennig ein neues Berechnungsmodell erarbeitet. Dabei werden neuerdings nicht mehr alle drei Distanzen als Beträge verstanden, sondern vektoriell jede Distanz der Zellen im Kontext berechnet und die Zellen in dem Farbschema Rot: z-Achse, Blau: x-Achse und Grün: y-Achse eingefärbt. Zugleich wird dementsprechend für jede Achse eine eigene maximale Entfernung definiert. Diese 3-D-Repräsentationen zeigen nun nicht mehr nur die fehlplatzierte Zelle und deren relative Fehlplatzierung im Vergleich zu den anderen fehlplatzierten Zellen innerhalb des Embryos. Die 3-D-Repräsentationen zeigen jetzt auch die Richtung der Abweichung an sowie ein qualitatives Farbschema. Dies führt dazu, dass die Achsen (obwohl sie unterschiedlich lang sind!) gleich bewertet werden. Damit werden mit der neuen Methode auch Zellen angezeigt, die z.B. auf der linken Seite des Embryos liegen, anstelle der rechten Seite (Y-Achse) (Abbildung 27 unten). Bei der alten Methode konnte dieser Unterschied nicht gezeigt werden, da unter anderem durch die Bildung des Betrags die Abweichung links-rechts immer dieselbe war (Abbildung 27 oben). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist zudem, dass auf einen Blick festzustellen ist, ob Zellen nur in eine Richtung abweichen oder sich chaotisch verirren, bzw. ob Gruppen von Zellen sich in dieselbe falsche Richtung bewegen. Dies macht die Interpretation der Fehlmigration leichter und könnte auf Subprozesse in der regionalen Identität hinweisen.

Bereitstellung der Mutanten für die Worm Community

Da bei diesem Mutagenese-Ansatz als „Nebenprodukte“ embryonal letale Mutanten mit den unterschiedlichsten Defekten isoliert und analysiert wurden, war die Idee, die Datenbank sowie die 4-D-Aufnahmen und natürlich die Mutanten auch anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung zu stellen. Dies führt dazu, dass zuerst die Aufnahmen verschickt werden (nachdem in der Datenbank die Stämme mit dem gewünschten Phänotyp herausgesucht wurden) und die Arbeitsgruppen eine Vorauswahl treffen, mit welchen Mutanten sie arbeiten möchten. Diese Stämme können dann verschickt werden. Kooperationen in diesem Zusammenhang laufen zu diesem Zeitpunkt mit den Laboren

Ergebnisse

von Frank Döring (Cytoplasma-Mutanten), Barbara Conradt (Zelltod-Mutanten), Tony Hyman (Zellzyklus- und Keimbahn-Mutanten), Pierre Gönczy (Zellzyklus-, Zellteilungs- und Keimbahn-Mutanten) und Don Moerman (Muskel-Mutanten). Zudem wurden 200 Mutanten für Don Moermans „One Million Mutant“-Projekt (WGS) zur Verfügung gestellt. Erste Rückmeldungen zeigen, dass für andere Arbeitsgruppen wahre Schätze unter diesen Mutanten stecken. So hat etwa Ryan Viveiros, ein Doktorand aus dem Labor von Don Moerman ein Allel von *oac-35* gefunden, welches (für ihn interessant) die Zellmorphologie von Muskelzellen verändert und auch deren Position beeinflusst. Unter den Cytoplasma-Mutanten für Frank Döring (Ernährungsphysiologie) fand sich eine Mutante, die eventuell neue Einsichten in den Fett-Metabolismus geben kann. Diese positiven Ergebnisse zeigen, dass durch die 4-D-mikroskopischen Aufnahmen ein besserer Eindruck vermittelt werden kann als durch eine reine Beschreibung der Mutanten. Zum anderen werden Aufwand und Kosten verringert, da auch nicht alle Mutanten mit einer groben Kategorisierung (z.B. Cytoplasma-Mutanten) aufgetaut und per Post verschickt werden müssen. Des weiteren unterstreicht die hohe Nachfrage nach den Aufnahmen, dass das Mutantenlese-Konzept der strikten ts-Selektion und embryonalen Letalität richtig war. In diesem Zusammenhang ist auch die Datenbank besonders wertvoll. Diese Katalogisierung der Mutanten macht es möglich, dass innerhalb weniger Tage auch sehr speziellen Anfragen entsprochen werden kann. Es bleibt für die Zukunft abzuwarten, welche interessanten Mutanten noch identifiziert werden.

Zellfokussierungskandidaten

Im weiteren werden nun zwei Mutanten beschrieben, die nach ihrer ersten Charakterisierung (Zelllinien-Analyse, Bioinformatik (3-D-Repräsentation, Distanzkarte, Differenzkarte und Antikörperfärbungen) als Zellfokussierungskandidaten eingeordnet wurden.

t3205 (let-19)

Ein potentieller Zellfokussierungskandidat meiner Doktorarbeit erwies sich als Überraschung, da er nach anfänglicher Untersuchung den gegenteiligen Phänotyp zu dem gesuchten zeigte. Bei *t3205* zeigte sich obwohl Schicksalstransformationen auftreten, dass die Zellen im prämorphogenetischen Stadium annähernd die gleichen Positionen einnehmen wie im Wildtyp. Dies erstaunt insofern, da theoretisch nicht klar war, ob solch eine Mutante überhaupt existieren kann. *t3205* widerspricht somit auf dem ersten Blick der These von Marcus Bischoff und Ralf Schnabel (2006) dass alle Zellen ihrem Schicksal entsprechend ihre Position im Embryo einnehmen.

Der Phänotyp von *t3205*

Erste Analysen von *t3205* zeigten, dass das Allel strikt temperatur-sensitiv ist und einen so genannten „Rührei“-Phänotyp aufweist. Interessanterweise tritt der Phänotyp relativ spät auf, so dass das prämorphogenetische Stadium zu Anfang normal erscheint und die schwerwiegende Fehl-Migration der Zellen erst am Ende dieses Stadiums stattfindet. Ein wichtiges Kriterium, auch für folgende Experimente, ist der Zeitpunkt in der Entwicklung,

Ergebnisse

an dem das Genprodukt benötigt wird. Hierzu kann eine ts-Kurve erstellt werden. Der Schnittpunkt der beiden Kurven grenzt somit den Zeitpunkt ein, an dem das Protein benötigt wird. Ergänzend zu den ersten Ergebnissen zeigt eine embryonale Temperatursensitive Kurve der Mutante (Abbildung 29), dass der Zeitpunkt, an dem das Genprodukt benötigt wird, zwischen dem 12-Zell und 100-Zell-Stadium liegt.

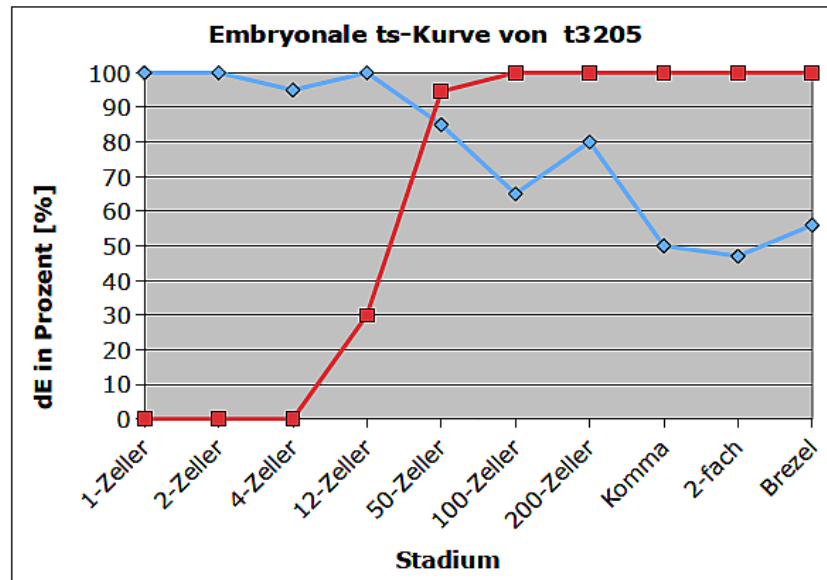


Abbildung 29: Embryonale ts-Kurve von *t3205*.

Bringt man die Embryonen von 15°C auf 25°C (*up-shift*, rot), so sieht man, dass es ab dem 12-Zellstadium erstmals Embryonen gibt, die den Temperaturwechsel überleben, und ab dem 100-Zellstadium überleben alle Embryonen. Entgegengesetzt dazu überleben beim *down-shift* (25°C → 15°C, blau) erste Embryonen auch ab dem 12-Zellstadium einen Temperaturwechsel, wohingegen die Überlebensrate der späteren Entwicklungsstadien zunimmt, jedoch nie eine 100% Überlebensrate erreicht wird.

Um den Eindruck des „normalen“ prämorphogenetischen Stadiums zu überprüfen und den Zeitpunkt des Defekts besser beschreiben zu können, wurden bei fünf unterschiedlichen Embryonen eine Zelllinienanalyse bis ins 256-AB-Zell-Stadium verglichen. Hierbei ist es nicht nur möglich zu verfolgen, ob die Zellen an ihrer richtigen Position liegen, sondern auch, ob sie ihr richtiges morphologisches Zellschicksal haben. Wie schon vermutet, liegen die Zellen relativ an den richtigen Positionen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 30 und Abbildung 5, Einleitung).

Ergebnisse

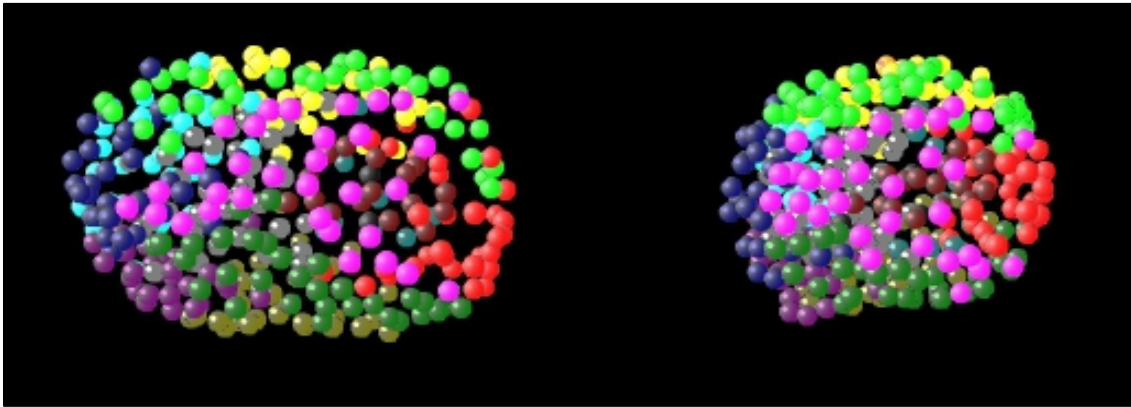


Abbildung 30: 3-D-Repräsentation zweier *t3205*-Embryonen.

Wie häufig bei *ts*-Mutanten zu beobachten ist, sind auch die Phänotyp-Ausprägungen von *t3205*-Embryonen unterschiedlich. Man erkennt in beiden 3-D-Repräsentationen sehr deutlich die Y-Struktur der ABarp-Region (pink). Ein Unterschied zu einem Wildtyp-Embryo ist nicht deutlich zu erkennen. Die RMS-Werten für die beiden Embryonen unterscheiden sich jedoch sehr. Der linke Embryo (Aufnahme: AW_t3205_1, rechter Embryo) hat einen RMS von 0,04. Dieser Wert liegt innerhalb der Werte die erreicht werden, wenn man zwei Wildtypen miteinander vergleicht. Im Gegensatz dazu hat der rechte Embryo (Aufnahme: AW_t3205_1, linker Embryo) einen RMS von 0,1. Dies bedeutet schon eine signifikante Abweichung von den Wildtypen. Wenn man das Bild genauer betrachtet, erkennt man, dass sich z.B. die ABara-Region (hellblau) sehr weit anterior befindet.

Bei den Distanz- und Differenzkarten aller fünf Embryonen gegeneinander (Abbildung 31 und 32) kann man erkennen, dass sie alle stark voneinander abweichen. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur der RMS sehr variabel ist, sondern auch in Embryonen mit einem vergleichbaren RMS die Defekte sehr variabel sind.

Ergebnisse

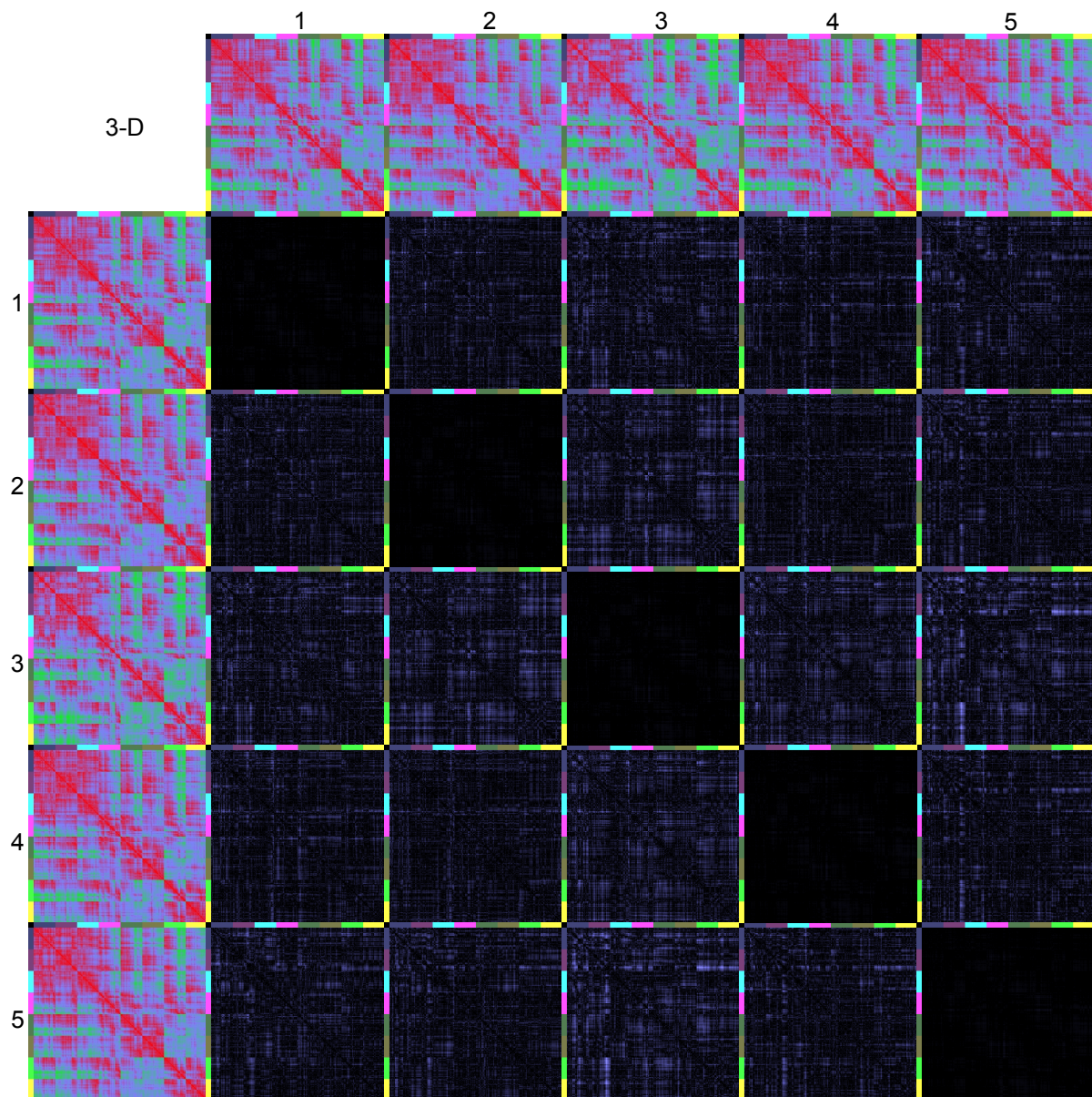
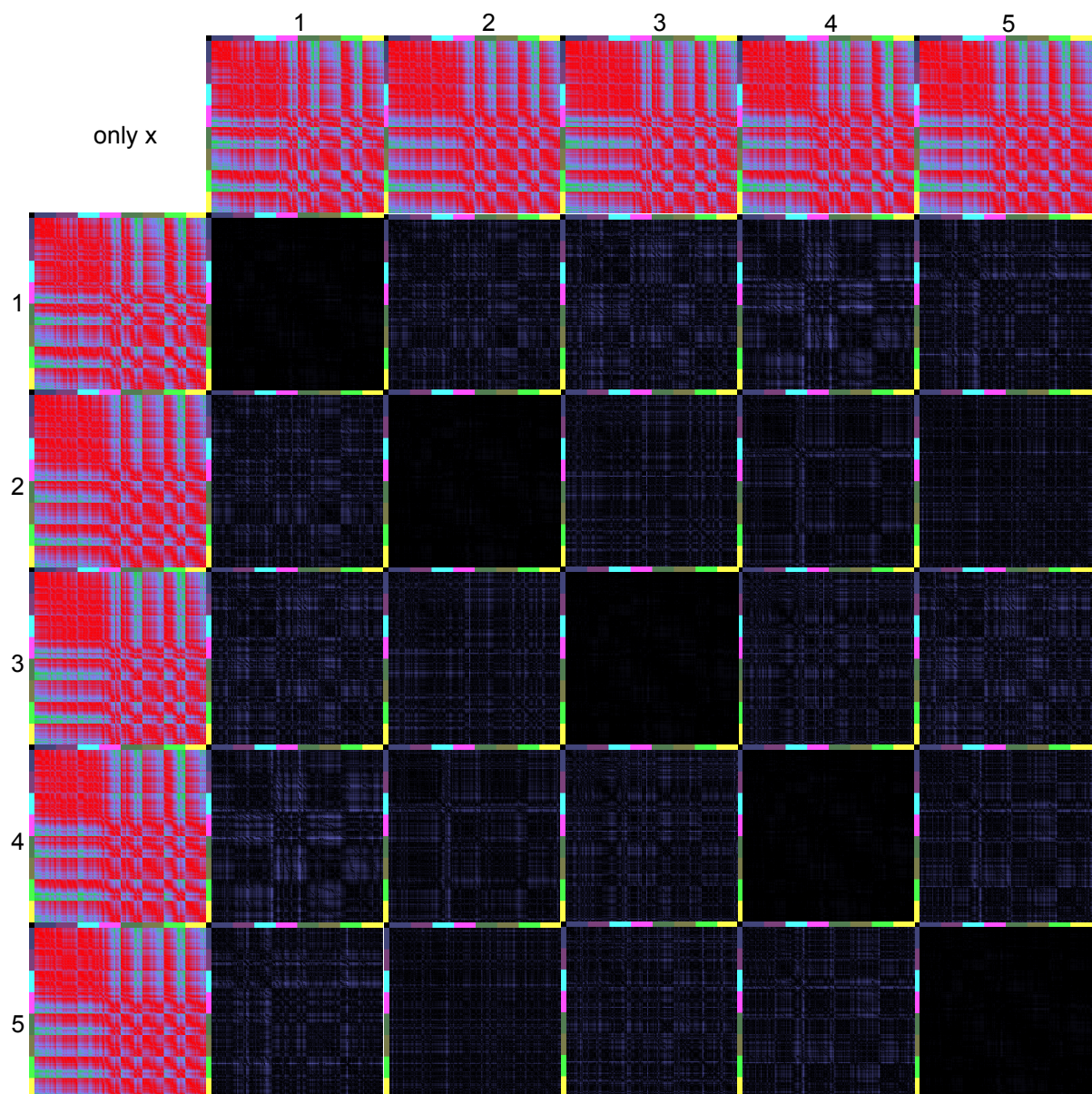


Abbildung 31: 3D-Distanz- und Differenzkarten aller fünf analysierten *t3205*-Embryonen gegeneinander. Wie schon aus den 3-D-Repräsentationen (Abbildung 30) vermutet, unterscheiden sich die Embryonen stark in ihren Zellpositionen voneinander. Besonders in den Differenzkarten wird ersichtlich, dass keine einheitliche Abweichung zu erkennen ist, die Differenzkarten müssten dann einheitlich schwarze Regionen aufzeigen.

- | | |
|--|---|
| 1) Aufnahme: AW_t3205_1, oberer Embryo | 2) Aufnahme: AW_t3205_1, unterer Embryo |
| 3) Aufnahme: AW_t3205_2, linker Embryo | 4) Aufnahme: AW_t3205_2, rechter Embryo |
| 5) Aufnahme: AW_22EII12_1 | |

Ergebnisse



*Abbildung 32: only x-Distanz- und Differenzkarten aller fünf analysierten *t3205*-Embryonen gegeneinander. Auch bei Vergleich aller x-Distanzkarten gegeneinander erscheint das Muster zufällig und keiner Logik zu folgen.*

- | | |
|--|---|
| 1) Aufnahme: AW_t3205_1, oberer Embryo | 2) Aufnahme: AW_t3205_1, unterer Embryo |
| 3) Aufnahme: AW_t3205_2, linker Embryo | 4) Aufnahme: AW_t3205_2, rechter Embryo |
| 5) Aufnahme: AW_22EII12_1 | |

Ergebnisse

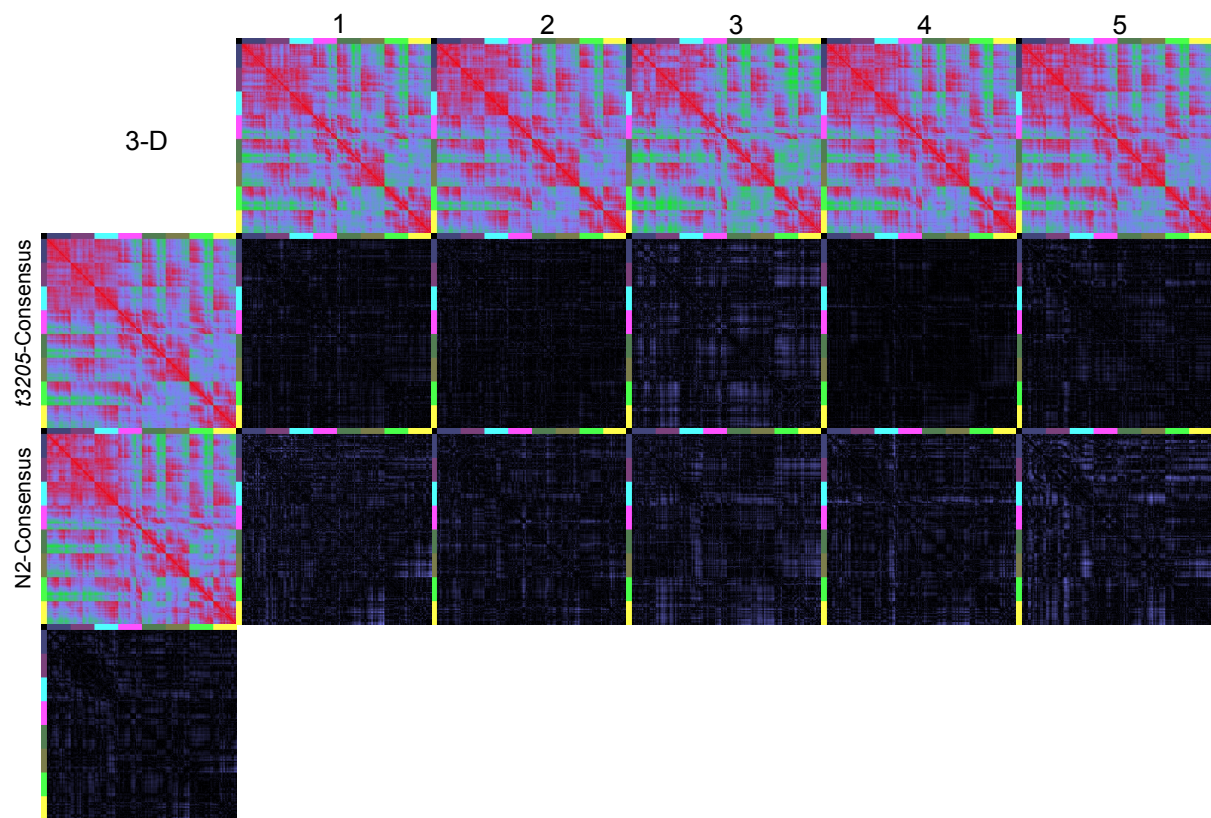


Abbildung 33: 3D-Distanz- und Differenzkarten von allen fünf *t3205*-Embryonen gegen den *t3205*- und Wildtyp-Konsensus.

Dieser Vergleich der fünf mutanten Embryonen zu den zwei Konsensus-Embryonen zeigt auf, welche individuelle Abweichung jeder mutante Embryo im direkten Vergleich zu den anderen vier Embryonen aufweist (*t3205*-Konsensus-Embryo gegen die fünf individuellen Embryonen) und zudem die reale Abweichung zum Wildtyp-Konsensus. Zieht man die beiden Konsensus-Embryonen voneinander ab (Differenzkarte links unten) erhält man die Abweichung von *t3205* zum Wildtyp, die alle fünf Embryonen gemeinsam haben.

- 1) Aufnahme: AW_t3205_1, oberer Embryo
- 2) Aufnahme: AW_t3205_1, unterer Embryo
- 3) Aufnahme: AW_t3205_2, linker Embryo
- 4) Aufnahme: AW_t3205_2, rechter Embryo
- 5) Aufnahme: AW_22EII12_1

Ergebnisse

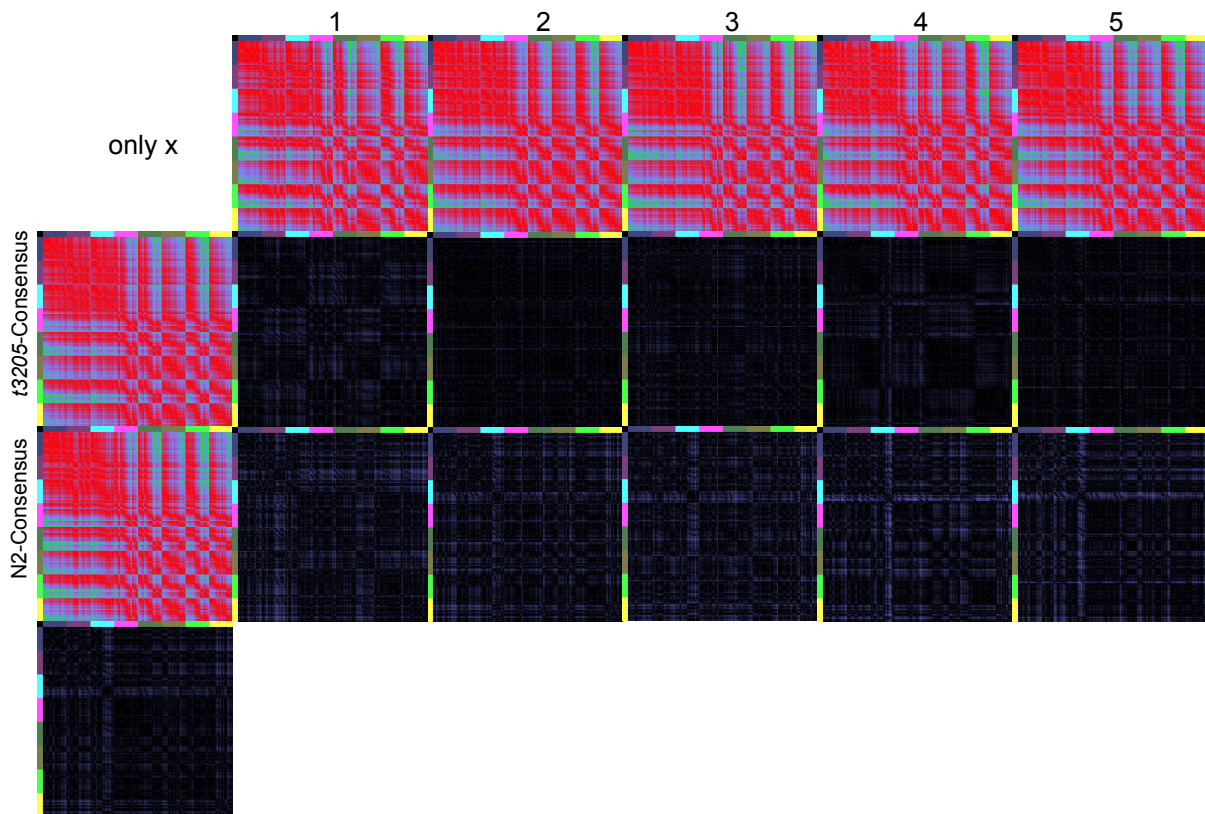


Abbildung 34: only x-Distanz- und Differenzkarten von allen fünf *t3205*-Embryonen gegen den *t3205*- und Wildtyp-Konsensus.

Interessanterweise ergibt sich bei dem Vergleich der Abweichungen in Richtung der x-Achse (a-p Achse), dass alle fünf *t3205*-Embryonen einen Defekt in der ABara-Region zeigen (Differenzkarten Wildtyp-Konsensus gegen die fünf Embryonen und beide Konsensus-Embryonen gegeneinander). Diese spezielle Abweichung geht im Rauschen der 3D-Karten unter.

- 1) Aufnahme: AW_t3205_1, oberer Embryo 2) Aufnahme: AW_t3205_1, unterer Embryo
- 3) Aufnahme: AW_t3205_2, linker Embryo 4) Aufnahme: AW_t3205_2, rechter Embryo
- 5) Aufnahme: AW_22EII12_1

Erstaunlicherweise zeigt sich bei der Differenzkarte der beiden Konsensus-Embryonen (Vergleich *t3205* gegen den Wildtyp) ein helles Kreuz in der ABara-Region (Abbildung 33 und Abbildung 34). Dies wird besonders in der only x-Darstellung der Karten sichtbar (Abbildung 34).

Um die Hypothese zu festigen, dass die Defekte, die in den Karten zu sehen sind, erst relativ spät in der Entwicklung auftreten, wurden auch Distanz- und Differenzkarten der früheren Entwicklung erstellt (Abbildung 35).

Ergebnisse

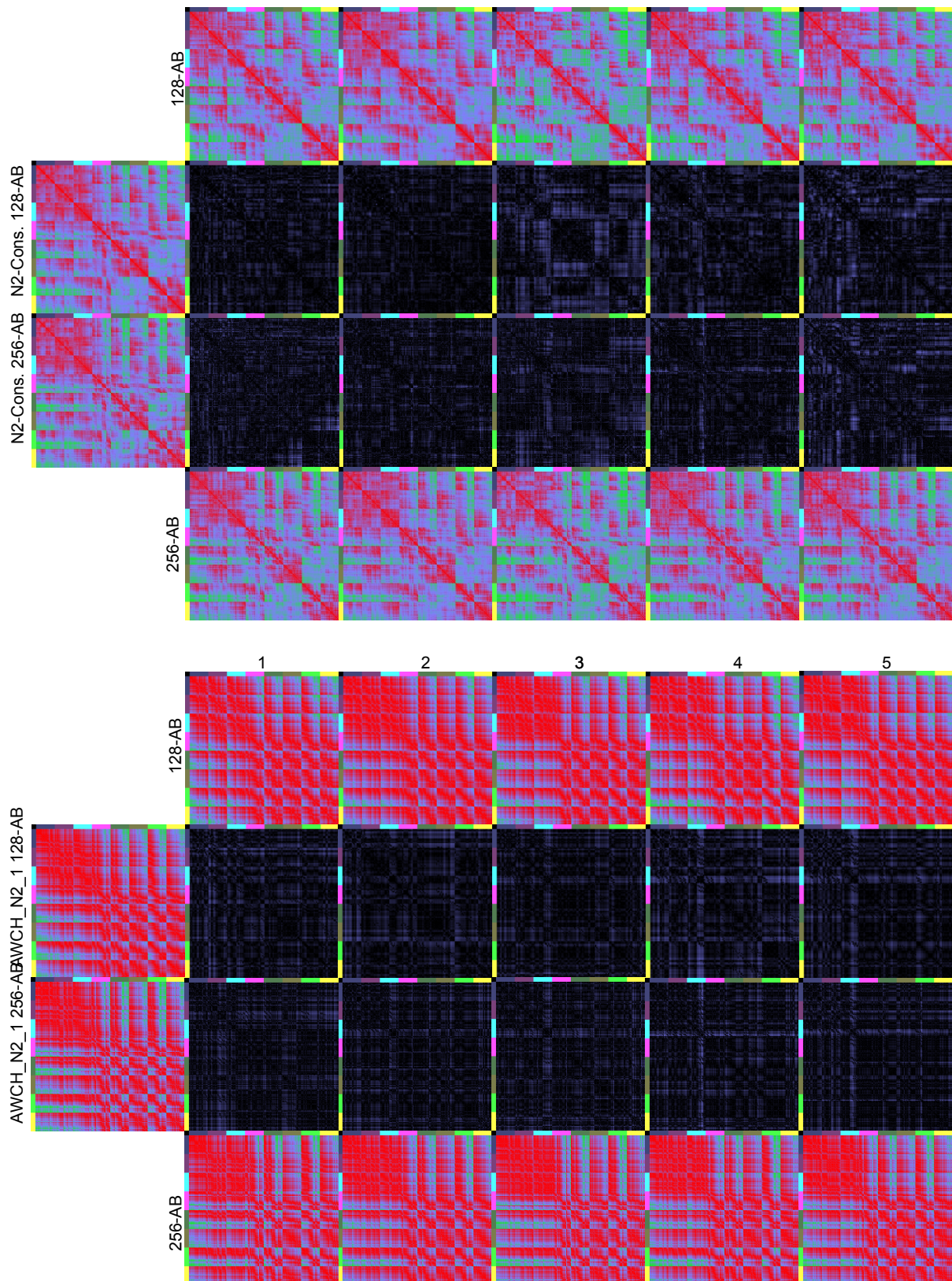


Abbildung 35: Vergleich der Distanz- und Differenzkarten der *t3205*-Embryonen mit dem Wildtyp im 128-AB-Zell- und 256-AB-Zellstadium (oben 3-D, unten only-x).

Ergebnisse

Wie man erkennen kann, sind die Embryonen auch schon im 128-AB-Zell-Stadium in Unordnung. Allerdings nimmt diese mit der Zeit noch zu. Interessanterweise scheinen die Defekte im 128-AB-Zell-Stadium am stärksten aus der x-Achse (only-x) zu kommen, während im 256-AB-Zell-Stadium der Einfluss der anderen Richtungen (y und z) zunimmt. Dies erkennt man daran, dass die Muster der only-x Differenzkarten im 128-AB-Zell-Stadium eine höhere Übereinstimmung mit den 3D-Differenzkarten zeigen, als im 256-AB-Zell-Stadium.

- 1) Aufnahme: AW_t3205_1, oberer Embryo 2) Aufnahme: AW_t3205_1, unterer Embryo
 3) Aufnahme: AW_t3205_2, linker Embryo 4) Aufnahme: AW_t3205_2, rechter Embryo
 5) Aufnahme: AW_22EII12_1

Die Distanz- und Differenzkarten der *t3205*-Embryonen im 128-AB-Zellstadium zeigt, dass auch schon in diesem Entwicklungsstadium Zellen falsch platziert sind. Allerdings scheint diese Fehlplatzierung stärker auf die a-p-Achse zurückzuführen zu sein, da die only-x- und 3D-Differenzkarten sich stärker ähneln als im 256-AB-Zellstadium (Abbildung 35). Dies bedeutet, dass im nächsten Zellstadium die Unordnung in alle anderen Richtungen zunehmen muss. Dies bestätigt die Beobachtung, dass während der Entwicklung die Unordnung/Fehlmigration in *t3205*-Embryonen zunimmt. Allerdings legen diese Ergebnisse auch nahe, dass die Schicksalstransformationen teilweise schon sehr früh stattfinden müssen, da es auch sehr ausgeprägte Muster (in x-Richtung) gibt, die sich schon früh ausprägen.

Ergänzend zu den bioinformatischen Ergebnissen zeigte sich bei der Analyse der Zellode, dass Schicksalstransformationen vorliegen müssen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Analysen des Zelltod-Musters in den einzelnen Zelllinien-Analysen von t3205-Embryonen.

Vergleicht man die prospektiven Zellode aller fünf Zelllinien-Analysen, so fällt auf, dass alle Regionen betroffen sein können. Jedoch deutet kein gemeinsames Muster auf eine allgemeine Transformation einer Region hin. Einzig CD#9 aus der ABplp-Region ist in allen Zelllinien transformiert. Da nicht auch die restlichen zwei Zellode dieser Region betroffen sind, kann es bedeuten, dass *t3205* eine spezifische Funktion in dieser Zelle hat, oder zufällig in allen Analysen dieser Zellode stirbt. +: Zelltod tritt auf (Vgl. Wildtyp), -: Zelltod tritt nicht auf (Vgl. Wildtyp), ?: nicht eindeutig zu bestimmen, ob Zelle apoptotisch ist.

Zelltod	Embryo 1	Embryo 2	Embryo 3	Embryo 4	Embryo 5
CD#1 (ala)	+	+	+	+	-
CD#2 (ala)	?	+	+	+	-
CD#3 (ala)	?	-	?	+	-
CD#4 (ala)	-	-	-	-	?
CD#5 (alp)	+	-	-	+	+
CD#6 (alp)	-	?	+	+	+
CD#7 (ara)	-	+	-	?	-
CD#8 (arp)	?	-	-	+	-
CD#9 (plp)	-	-	-	-	-
CD#10 (plp)	?	-	-	+	-
CD#11 (plp)	+	+	+	+	-

Ergebnisse

CD#12 (prp)	-	+	+	-	+
CD#13 (prp)	-	-	+	-	+
CD#14 (MS)	+	-	-	?	?

Auffällig ist hierbei, dass es keine konservierten Muster gibt, die darauf hinweisen, dass an einem bestimmten Zeitpunkt der Lineage eine Blastomere in eine andere Blastomere, z.B. auf Grund einer fehlenden Induktion, transformiert wurde (siehe z.B. *glp-1*). Diese Ergebnisse machten eine Antikörperfärbung um so interessanter, da schon in den 4-D-Aufnahmen darüber spekuliert wurde, ob diese Mutante eventuell einen zu kleinen Pharynx ausbildet. Aus diesem Grund wurden Darm-, Muskel-, Pharynx- sowie Hypodermis-Zellen mit Antikörpern gefärbt (Abbildung 36).

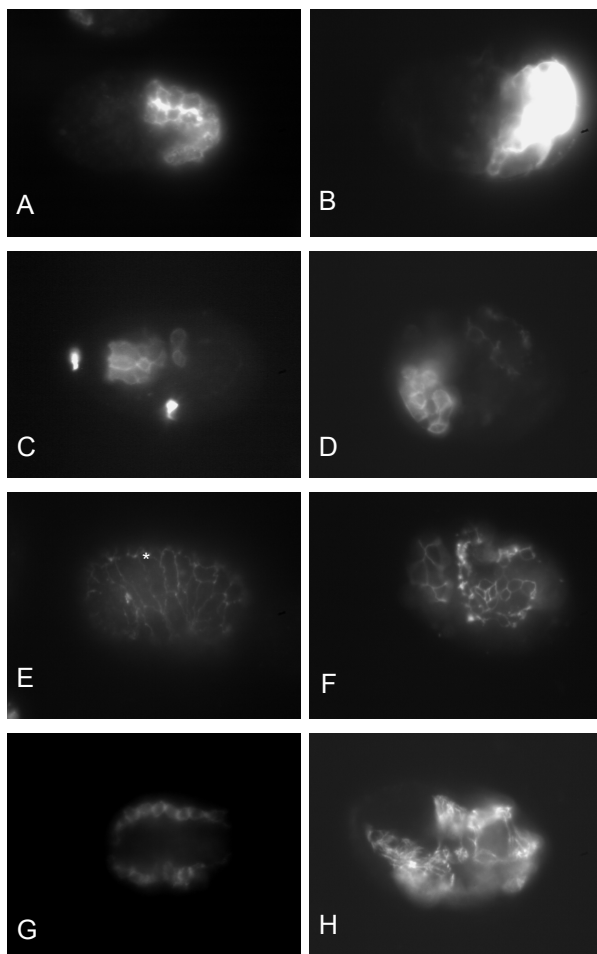


Abbildung 36: Antikörperfärbungen von N2- und *t3205*-Embryonen.

A,B) Die Darmzellen mit ICB4 gefärbt. Diese 20 Zellen liegen im Wildtyp wie auch in *t3205* in einem Cluster im posterioren Bereich des Embryos. Der Pharynx (C) ist im Wildtyp ebenfalls als Cluster angelegt und wurde mit 3NB12 gefärbt. Der in *t3205* angelegte Pharynx (D) ist fast halb so groß (13,83 Zellen, $\pm 0,8$), im Vergleich zum Wildtyp (21 Zellen). In (E) wurden die Hypodermis-Zellen mit MH27 dargestellt. Am Ende des prämorphogenetischen Stadiums, zu Beginn der Morphogenese, wird der Embryo komplett von Hypodermis-Zellen umgeben, wobei einige Zellen fusionieren (*) und ein Synzytium bilden. In *t3205* reihen sich einzelne Hypodermis-Zellen zwar noch auf, jedoch ist das Muster zerrissen und die Haut kann sich nicht um den Embryo schließen. Die Muskelzellen sind mit 5-6 angefärbt, bevor diese im Wildtyp (G) fusionieren. Dabei werden vier Bänder angelegt, die später den Wurm umgeben. In *t3205* (H) ist die Anzahl der Muskelzellen (31,67, $\pm 1,53$) im Vergleich zum Wildtypen (80 Zellen) um über die Hälfte reduziert. (n= 10)

ICB4 färbt die Darmzellen im Embryo. Es wurde bisher noch nicht herausgefunden, an welche spezielle Darmstruktur, bzw. welches Protein der Antikörper bindet. Im Wildtyp Embryo färbt ICB4 20 Zellen (Abbildung 36 A), die im posterioren, inneren Teil des Embryos als Cluster liegen. Außerdem werden noch späte Drüsenzellen und Neuronen angefärbt, die sich von den Darmzellen jedoch gut unterscheiden lassen.

Der Pharynx-spezifische Antikörper 3NB12 färbt im Wildtyp 21 Pharynx-Muskelzellen (Abbildung 36 C). Diese bilden wie auch die Darmzellen ein Cluster. Allerdings befindet

Ergebnisse

sich dieses Cluster im anterioren, inneren Teil des Embryos und grenzt direkt an das Darm-Cluster. 3NB12 bindet an Glykoproteine der Pharynx-Muskelzellen.

MH27 ist ein Antikörper, der in den Hypodermis-Zellen an die Desmosomen bindet. Im Wildtyp-Embryo kann man sehen, dass die Hypodermis-Zellen den kompletten Embryo einschließen und auch, dass einige Zellen fusionieren und so große synzytiale Zellen (z.B. *hyp 4* oder *hyp 7*) bilden (Abbildung 36 E). Dies macht es etwas schwer die Zellzahl zu bestimmen, da durch die Membranfärbung nicht zu erkennen ist, ob es eine extrem große Zelle oder schon fusionierte Zellen ist.

Die Muskelzellen werden von dem Antikörper 5-6 gefärbt. 5-6 bindet an Paramyosin, einem Invertebraten spezifischen Muskelprotein, welches den Kern der Muskelfaser bildet. Der Wildtyp hat 80 Muskelzellen (Abbildung 36 G). Diese bilden an den Rändern des Embryos vier charakteristische Bänder. Wie auch bei der Hypodermis fusionieren die Muskelzellen während der Entwicklung, so dass später nur noch die Fibrillen zu erkennen sind, jedoch keine einzelnen Zellen.

Die Antikörperfärbungen von *t3205*-Embryonen konnten den Verdacht bestätigen, der bei Durchsicht der 4-D-Aufnahmen entstand. *t3205* hat einen zu kleinen Pharynx (Abbildung 36 D). Die Auszählung der Pharynx-Muskelzellen ergab 13,83 ($\pm 0,8$; min: 12 max: 15) Zellen. Des weiteren hat *t3205* zu wenig Muskelzellen 31,67 ($\pm 1,53$; min: 29 max: 35) (Abbildung 36 H). Die Zahl der 20 Darmzellen entspricht der Anzahl von Zellen im Wildtypen (Abbildung 36 B). Die Hypodermis ist komplett zerrissen (Abbildung 36 F). Der charakteristische Phänotyp bei Antikörperfärbungen mit einem halben Pharynx und reduzierter Muskelzell-Anzahl ist häufig auf eine Mutation in dem Gen *glp-1* zurück zu führen. Bei GLP-1 handelt es sich um ein *C. elegans* Ortholog des Transmembran-Rezeptors Notch, der zur Zell-Zell-Kommunikation beiträgt und im frühen Embryo die a-p-Induktion von ABxx steuert (siehe Einleitung). Interessanterweise zeigen die beiden Allele des Rezeptors und Liganden unterschiedliche embryonale Defekte (siehe Einleitung). Die Distanzkarten von *t3205* sind zwar anders als die von *glp-1* und *apx-1*, aber dennoch könnte es sich um ein Gen (schwaches Allel) innerhalb des Delta-Notch Signalwegs handeln.

Ausschluss von *t3205* als neues Allel des Gens *glp-1* oder *apx-1*

Um die Hypothese zu testen, dass es sich um eine Mutation in *glp-1* oder *apx-1* handeln könnte, wurde mit beiden Genen ein Komplementationstest in *t3205* durchgeführt. In beiden Fällen konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl *glp-1(e2144)* wie auch *apx-1(t2063)* *t3205* komplementieren. Als Kontrolle für die Komplementationstests sowie als Ausschluss, dass die Mutation vielleicht in der Nähe eines der Gene liegt und somit einen Effekt auf *glp-1* oder *apx-1* hat, wurde *t3205* grob auf ein Chromosom kartiert. Die Kreuzung ergab, dass *t3205* relativ nah an *unc-4* gekoppelt ist und demnach relativ mittig auf Chromosom II liegen muss (Tabelle 6). Dieses Ergebnis bestätigte die beiden Komplementationstests mit *glp-1^{III}* und *apx-1^V*.

Ergebnisse

Tabelle 6: Auswertung der F₂-Generation der Kreuzung von MSIII mit *t3205*.

Nur Würmer, die nur für jeweils einen der sichtbaren Marker homozygot waren, wurden als L₄-Larven vereinzelt und auf Temperatur-Sensitivität getestet. Laut der Theorie (Tabelle M1, Anhang) erwartet man einen Anteil von 25% Temperatur-sensitiven Wümmern pro Marker, sollten die Gene nicht gekoppelt sein. Die Segregation gilt für *dpy-1(e61)* und *lon-1(e185)*. Für *unc-4(e120)* weicht das Verhältnis 3:1 jedoch stark ab. Mit 3,2% Doppel-Mutanten sind diese fast gar nicht vorhanden. Dies bedeutet, dass die Temperatur-sensitive Mutation auf Chromosom II liegen muss. Die geringe Rekombinationsrate lässt ahnen, dass die beiden Gene relativ nah beieinander liegen sollten.

Sichtbarer Marker	Anzahl vereinzelter F ₂ -Nachkommen	Nicht Temperatur-sensitiv	Temperatur-sensitiv	% Temperatur-sensitiv
<i>dpy-1(e61)</i> ^I	44	31	13	29,5
<i>unc-4 (e120)</i> ^{II}	31	30	1	3,2
<i>lon-1 (e185)</i> ^{III}	30	21	9	30

Da der Phänotyp unserer Hypothese widersprach und es noch weitere Mitglieder der Delta/Notch Familie im *C. elegans* Genom gibt (z.B. *lag-2*), wurde entschieden, diese Mutante mittels Whole Genome Sequencing (WGS) (Durchführung siehe unten WGS *t3206*) zu sequenzieren.

Identifizierung von *t3205* als neues Allel des Gens *let-19*

Die Sequenzdaten aus New York bestätigten als erstes das Ergebnis aus der Kreuzung mit MS III. Auch hier wurde die Mutation auf die Mitte von Chromosom II kartiert. Wie uns Richard Poole (Post-Doc aus dem Labor von Oliver Hobert) auch gleich mitteilte, war jedoch auffällig, dass es in diesem Stamm nach Aussortierung aller bekanntermaßen auftretenden Hintergrundmutationen mit genau einem vorher sequenzierten Stamm eine Übereinstimmung von vier *missense*-Mutationen in vier gleichen Genen gab. Von diesen vier Mutationen betrafen drei den gleichen Basen-Austausch, wohingegen die beiden Stämme sich in ihrer Mutation in *let-19* unterschieden. Es handelte sich bei dem andern Stamm um *let-19 (t3219)*. Diesen Stamm isolierte Katharina Luthe aus einem anderen Mutagenese Ansatz (NE) und hatte ihn zwei Monate zuvor in New York sequenzieren lassen. Im Rahmen dieses Projektes, suchte auch sie nach einer Zellfokussierungsmutante mit einem vergleichbaren Phänotyp.

LET-19 besteht aus 2862 Aminosäuren. Die beiden Allele unterscheiden sich in der Lage ihrer Mutationen. *t3205* hat einen Aminosäure-Austausch relativ mittig (G1682R) innerhalb des Proteins, wohingegen bei *t3219* die Mutation relativ weit hinten (L2294F) liegt. Dies könnte die unterschiedlichen Ausprägungen der Phänotypen erklären. Das hier vorgestellte Allel ist embryonal letal und zeigt diverse Schicksalstransformationen. Das Allel *t3219* ist zwar auch embryonal letal, jedoch konnte Katharina Luthe keine Schicksalstransformationen nachweisen (Dissertation 2012). Vergleicht man die Bioinformatik für beide Allele mit den Konsensus-Embryonen, die für jedes Allel erstellt wurden, erkennt man deutlich in beiden Bildern das Kreuz in ABara (Abbildung 37).

Ergebnisse

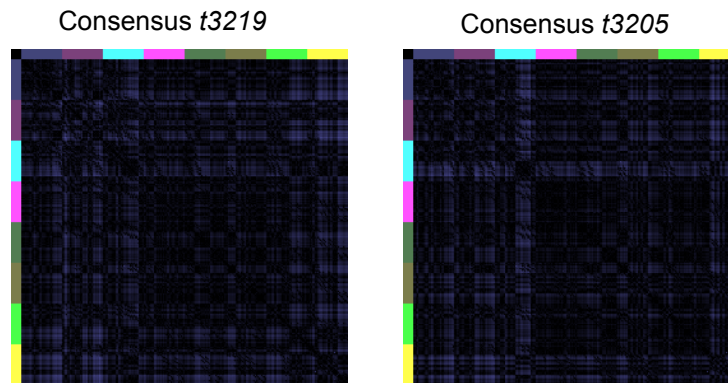


Abbildung 37: Der *t3205*-Konsensus (3-D) im direkten Vergleich gegen den *t3219*-Konsensus. Beide only x-Differenzkarten gegen den Wildtyp-Konsensus zeigen den Defekt in der ABara-Region. Die beiden Allele unterscheiden sich jedoch darin, dass bei *t3219* der Defekt in ABara nicht so ausgeprägt ist, wie in *t3205*. Jedoch hat *t3219* noch einen zusätzlichen Defekt in der ABpra-Region.

Des weiteren unterscheiden sich die embryonalen ts-Kurven. *t3205* (Abbildung 29) zeigt, im Vergleich zu *t3219* (Dissertation Katharina Luthe), eine frühere Funktion von LET-19 an. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *t3205* das stärkere der beiden Allele ist. Katharina konnte ihr Allel durch Komplementation mit einem Fosmid, sowie einen Komplementationstest mit einem Stamm, der eine Defizienz für *let-19* trägt, als ein Allel von *let-19* bestätigen (Dissertation Katharina Luthe, 2012). Durch eine Kreuzung in *t3219* konnte ich nachweisen, dass es sich bei *t3205* ebenfalls um ein Allel von *let-19* handeln muss. Der Komplementationstest wurde mit homozygoten Hermaphroditen des Stammes *t3205* und homozygoten Männchen des Stammes *let-19* (*t3219*) durchgeführt. Da von drei gekreuzten Hermaphroditen, jeweils vier getestete L₄-Larven nur tote Eier als Nachkommen legten, handelt es sich bei *t3205* auch um ein Allel des Gens *let-19*.

Als weiterer Nachweis wurde *t3205* mit dem Plasmid pHE780_let_19 erfolgreich komplementiert. Von dem Plasmid war zuvor schon bekannt, dass es auch *t3219* komplementiert. Dieses Ergebnis vervollständigt die Ergebnisse der Komplementation mit *t3219*.

LET-19 als Teil des Mediator-Komplexes in *C. elegans*

Das Gen *let-19* kodiert für ein Protein, das ein fakultativer Teil des Mediator-Komplexes (Abbildung 38) von *C. elegans* ist und während der Embryogenese als regulative Untereinheit gebraucht wird (CDK-Domäne, Abbildung 39). Der Mediator-Komplex ist von der Hefe bis zum Menschen ein hoch konservierter Multi-Protein-Komplex, der bei der Transkription u. a. hilft, Proteinwechselwirkungen an die RNA-Polymerase II zu vermitteln (z.B. Bindung an die GTF) (Casamassimi, A. und Napoli, C., 2007).

Ergebnisse

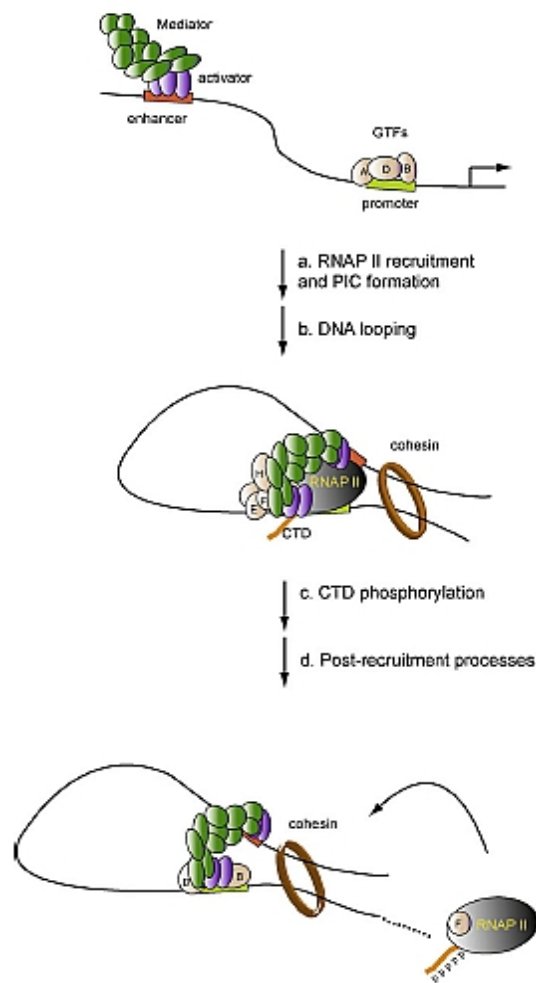


Abbildung 38: Vermittlung des Mediator-Komplexes zur Initiation der Transkription.

Indem der Mediator-Komplex die Bindung zwischen den GTFs und der RNA-Polymerase II vermittelt, bildet sich der PIC. Des weiteren wird die Bindung und Regulation zu entfernten DNA-Sequenzen (hier: enhancer) vermittelt, indem die DNA in ein Schlaufe gelegt wird, und so eine räumliche Nähe der Sequenzen zu einander ermöglicht wird und die RNA-Polymerase II phosphoryliert werden kann und die Transkription starten kann. *Abbildung aus Borggreffe, T. und Yue, X., 2011.*

Ohne den Mediator-Komplex ist in eukaryotischen Zellen keine Transkription möglich. Im Gegensatz zu Prokaryonten kann in Eukaryonten die RNA-Polymerase II nicht direkt an die DNA binden, um die mRNA zu synthetisieren. Bevor dieses stattfinden kann, müssen zuvor andere Proteine (z.B. TATA-binding protein) binden, welche die Transkription initialisieren (auch GTFs genannt: *general transcription factors*), damit die RNA-Polymerase an den Promotor binden kann. Dieser Prozess wird unter anderem von dem Mediator-Komplex begleitet und auch andere Funktionen, wie z.B. die Vermittlung zu Enhancer Sequenzen, die einige Kilobasen von dem Promotor entfernt liegen können (Abbildung 38). Der Mediator-Komplex kann sich aus bis zu 30 Proteinen zusammensetzen (Humaner Mediator-Komplex) unter denen z.B. auch Cyclin abhängige Kinasen (CdK) sind (Abbildung 39). Dies ist ein hoch komplexer Weg zur Feinregulation der Transkription. Aufgrund dieser Funktion kann die Zusammensetzung des Mediator-Komplexes je nach Zelltyp und Differenzierungsgrad der Zelle variieren. Studien zeigen,

Ergebnisse

dass der Mediator unabdingbar zur Bildung des PIC (*pre-initiation complex*) ist, allerdings sind weitere Funktionen, wie Repression oder Enhancement der Transkription nur bei wenigen Genen untersucht und eine allgemeine Aussage kann nicht getroffen werden. Weiter wird vermutet, dass der Mediator auch *downstream* Funktionen (nach der Initiierung) haben kann. Wie diese Funktion jedoch aussehen könnte, ist noch nicht geklärt (Borggreve, T. und Yue, X., 2011 und Casamassimi, A. und Napoli, C., 2007).

In *C. elegans* sind die Hauptkomponenten des Mediator-Komplexes weitestgehend identifiziert und kloniert. LET-19 (auch MDT-13) ist ein konserviertes Protein, das eine Untereinheit der CDK-Domäne ist. Die CDK-Domäne ist nicht ein dauerhafter Teil des Mediator-Komplexes, sondern wurde erstmals als Transkriptionsrepressor beschrieben. Dies liegt daran, dass elektronenmikroskopische Aufnahmen des Mediator-Komplexes zeigten, dass die CDK-Domäne an den Mediator-Komplex gebunden die Bindungsstelle für die RNA-Polymerase II besetzt. Erstaunlicherweise haben jedoch weitere Experimente (ChIP on chip) gezeigt, dass die CDK-Domäne auch an stark transkribierten Genen bindet. Dies widerspricht der Hypothese, dass die CDK-Domäne ein reiner Repressor sein soll. Im Gegensatz zu dem Mechanismus der Repression ist bisher noch nicht bekannt, wie die CDK-Domäne zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate beitragen kann. Da jedoch von dem Mediator-Komplex bekannt ist, dass er in seiner Konformation extrem flexibel ist, wird vermutet, dass es mit der Struktur des Komplexes zusammenhängt (Borggreve, T. und Yue, X., 2011).

Weitere Proteine der CDK-Domäne sind CDK-8 (*C. elegans cdk-8*), Cyclin C (*cic-1*) und MED12 (*dpy-22/sop-1/mdt-12*). In *C. elegans* sind für alle diese Gene Mutationen und RNAi-Experimente bekannt. *cdk-8* und *mdt-12* zeigen auch einen embryonal letalen Phänotyp. Für *cic-1* wurde bisher noch kein Phänotyp beobachtet (Wormbase WS229, Wang, J. et al., 2004)

Ergebnisse

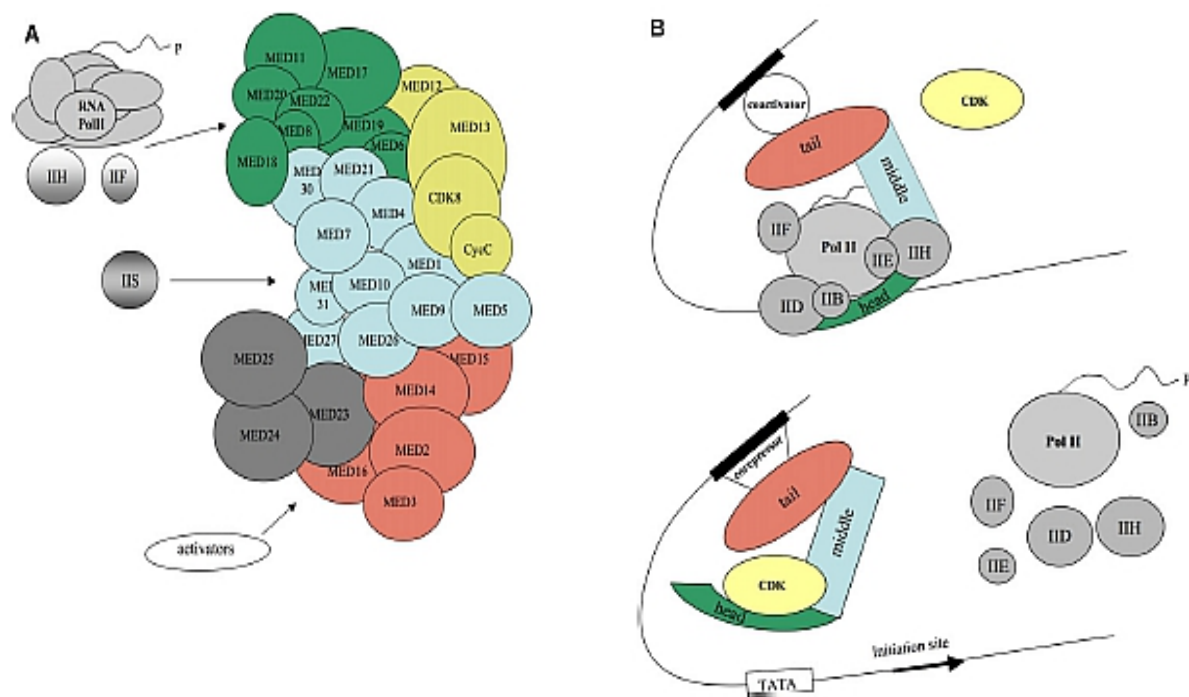


Abbildung 39: Modell der Zusammensetzung des Mediator-Komplexes und seiner Domänen, sowie ein mögliches Modell zur Mediator-Komplex – RNA-Polymerase II – Interaktion.

Nachdem die konservierte Funktion des Mediator-Komplexes in unterschiedlichen Organismen nachgewiesen wurde, wurde eine allgemeine Nomenklatur eingeführt. In Bild A werden schematisch die Proteine gezeigt, und wie diese die einzelnen Domänen bilden. MED13 (LET-19) bildet einen Teil der CDK-Domäne (gelb). In Bild B wird gezeigt, wie die CDK-Domäne als regulatorische Untereinheit die Transkription reprimieren kann, indem sie die Bindungstasche der RNA-Polymerase II besetzt (B unten). Ist die CDK-Domäne nicht an den Mediator-Komplex gebunden, ändert dieser seine Konformation und die Bindung der RNA-Polymerase II an die Promotor-Region kann vermittelt werden. Abbildung aus Casamassimi, A. Und Napoli, C., 2007.

In der CDK-Untereinheit von *C. elegans* sind, gerade im Zusammenhang mit der Regulation einzelner Gene während der Entwicklung, *let-19* und *dpy-22* aufgefallen. Diese beiden Gene zeigen einen ähnlichen Phänotyp, jedoch konnte gezeigt werden, dass ihre Funktion nicht redundant ist (Yoda, A. et al., 2005)). Bisherige Arbeiten zeigten, dass zwar gerade LET-19 reprimierende Funktionen hat, z.B. bei der regulativen Stilllegung der Vulva-Vorläuferzellen (VPCs, *vulva precursor cells*) (Clayton, J., van den Heuvel, S. und Saito, R., 2007). Dem entgegen konnte aber auch gezeigt werden, dass es auch transkriptionsfördernde Funktionen in spezifischen Geweben hat (z.B. Hypodermis und Muskelzellen) (Wang, J. et al., 2004). Wie die unterschiedlichen Mechanismen hinter diesen sehr unterschiedlichen Funktionen sein könnten, ist bisher noch nicht bekannt. Allerdings wird spekuliert, dass durch Konformations- und Protein-Kombinationsänderungen der Mediator-Komplex zu vielfältigen Regulationsmechanismen imstande ist (Clayton, J., van den Heuvel, S. und Saito, R., 2007).

Expression von *let-19::H2B::GFP* im Embryo

Da bisher nur wenige Daten zu der Expression und Funktion von *let-19* während der Entwicklung von *C. elegans* bekannt sind, wurde beschlossen einen eigenen Stamm herzustellen, der ein GFP-Expressionsmuster zeigt. Diese Entscheidung wurde dadurch bestärkt, dass unsere Daten (z.B. die ts-Kurve: Funktion im frühen Embryo) bisherigen Expressionsstudien (Yoda, A. et al., 2005) widersprachen. Bei dem Versuch, das Expressionsmuster des bekannten Stammes bei uns im Labor zu reproduzieren, zeigte der Stamm von Hitoshi Sawa keine GFP-Expression mehr (pers. Kommunikation Katharina Luthe). Hinzu kam, dass das Transgen (als Plasmid) von der anderen Arbeitsgruppe nicht mehr gefunden werden konnte. Der Versuch, die Mutanten (*t3219* und *t3205*) mit dem Plasmid pHE780_let_19GFP (Plasmid pHE780_let_19, dem an dem Stopcodon noch eine GFP-Kassette eingefügt wurde) zu komplementieren, scheiterte mit beiden Stämmen. Dies deutet darauf hin, dass die Tertiär-Struktur von LET-19 durch das GFP gestört sein könnte und die Konformationsänderung zu einem Funktionsverlust von LET-19 führt. Es könnte auch die Bindung/Funktion der CDK-Domäne verhindert werden. Aus diesem Grund wurde von Sophie Ziegler ein Plasmid mit einem Histon-2B-GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *let-19*-Promotors subkloniert. Dieses Plasmid wurde von Sophie in den Wildtyp transformiert und stabile Linien per 4-D-Aufnahmen analysiert.

Ergebnisse

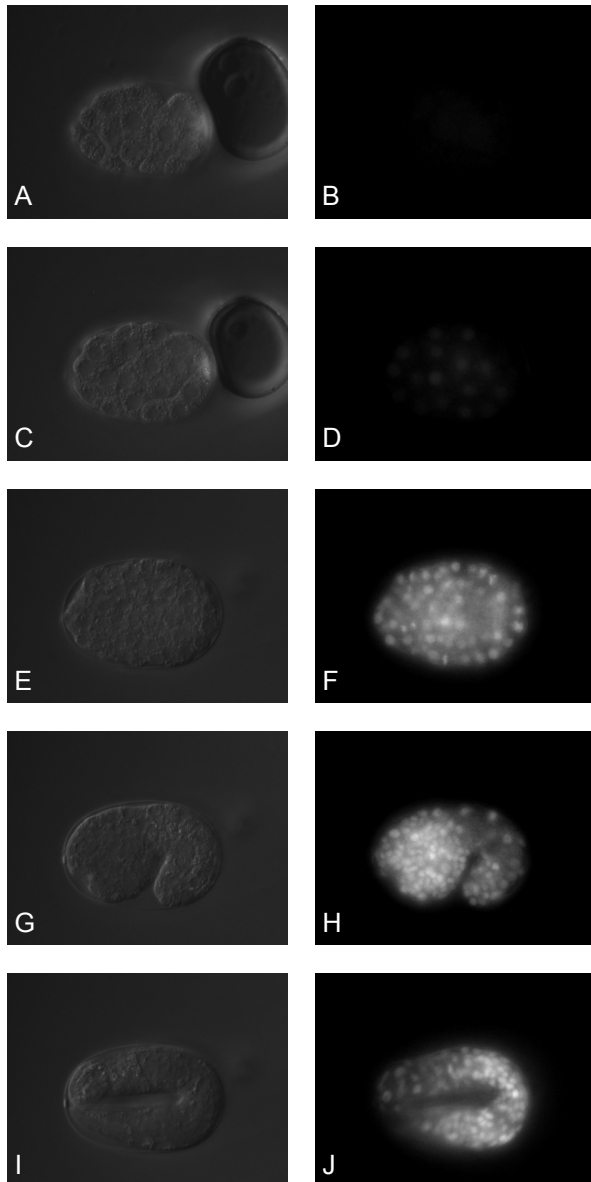


Abbildung 40: Expressionsmuster des *let-19::H2B::GFP*-Transgens über die Embryogenese von *C. elegans*.

Die früheste Expression von *let-19* kann man in den Darmzellen während der Gastrulation erkennen (A-B). Die Expressionsstärke nimmt zu und innerhalb einer Zellteilungsrunde exprimieren nahezu alle Zellen das Transgen (C-D). Im prämorphogenetischen Stadium (E-F) exprimieren dann alle Zellen sehr stark das GFP-Fusionsprotein. Diese Expression verändert sich bis zum Ende der embryonalen Entwicklung, wenn die Larve schlüpft, nicht mehr.

In Abbildung 40 ist ein Überblick über die beobachtete Expression des Transgens gegeben. Wie ich meinen bisherigen Daten entsprechend erwartet hatte, beginnt die Expression von *let-19* relativ früh im 20-50 Zellstadium. Die ersten exprimierenden Zellen sind Darmzellen (Abbildung 40 A und B). Kurze Zeit später exprimieren nahezu alle Zellen das Transgen (Abbildung 40 C-H). Diese Expression hält bis zum Ende der embryonalen Entwicklung an (Abbildung 40 I und J). Sollte dieses Promotor-Expressionsmuster mit der Expression des Proteins übereinstimmen, lässt dieses viele Spekulationen über die Funktion von LET-19 im allgemeinen und über das Allel *t3205* zu. Es stellt sich die Frage, welche Prozesse LET-19 als Teil der Transkriptionsmaschinerie steuert und ob in *t3205* eine Restaktivität des Proteins bestehen bleibt. Da die Möglichkeit besteht, dass LET-19 sowohl zur Transkriptionsrepression wie auch zur Transkriptionserhöhung beitragen kann, wäre eine Analyse der Transkriptionsraten in der Mutante interessant. Eventuell ist in der Mutante nur eine Funktion eingeschränkt/verloren oder es zeigt in unterschiedlichen Geweben unterschiedliche Mechanismen in der Differenzierung der Zellschicksale auf.

Ergebnisse

Bezieht man diese Überlegungen auf den oben beschriebenen Phänotyp, ist es erstaunlich, dass die Embryonen in der Lage sind Gewebe zu differenzieren, da eine grundlegende zellbiologische Funktion (Transkription) betroffen ist. Da in *let-19(t3219)* sogar die Zellschicksale erhalten bleiben, vermute ich, dass beide Allele keine Null-Allele sind. Des weiteren zeigt *let-19(t3205)*, dass die Funktion nicht nur basal in der Transkription liegen kann, da hier spezifisch ein Gewebetyp (Pharynx) nicht korrekt induziert wird. Dieses Ergebnis spricht auch für eine spezifische Gen-regulatorische Funktion von LET-19 bei der Entwicklung. Dies wurde für andere Allele in anderen Geweben beschrieben (Wang, J. et al., 2004).

t3206 (sem-4)

Als weiteren interessanten Zellfokussierungskandidaten isolierte ich ND_22_H4. Nach zweimaligen Auskreuzen bleibt der Phänotyp erhalten, wobei eine hohe Variabilität in der Ausprägung des Phänotyps beobachtet wurde. Dies machte die Mutante umso interessanter, da erwartet wird, dass Zellfokussierungsmutanten ihrer spezifischen Natur entsprechend eine hohe Variabilität und Pleiotropie aufweisen. Dies beruht auf der Annahme, dass die Zellen bei einem Ausfall ihrer Orientierung zufällig migrieren sollten und dementsprechend kein reproduzierbares Muster erzeugen.

Der Phänotyp von *t3206*

Im Fall von *t3206* ergibt sich aus der embryonalen ts-Kurve ein Zeitfenster vom 12-/50-Zeller bis etwa zum Komma-Stadium, in der das Protein benötigt wird (Abbildung 41).

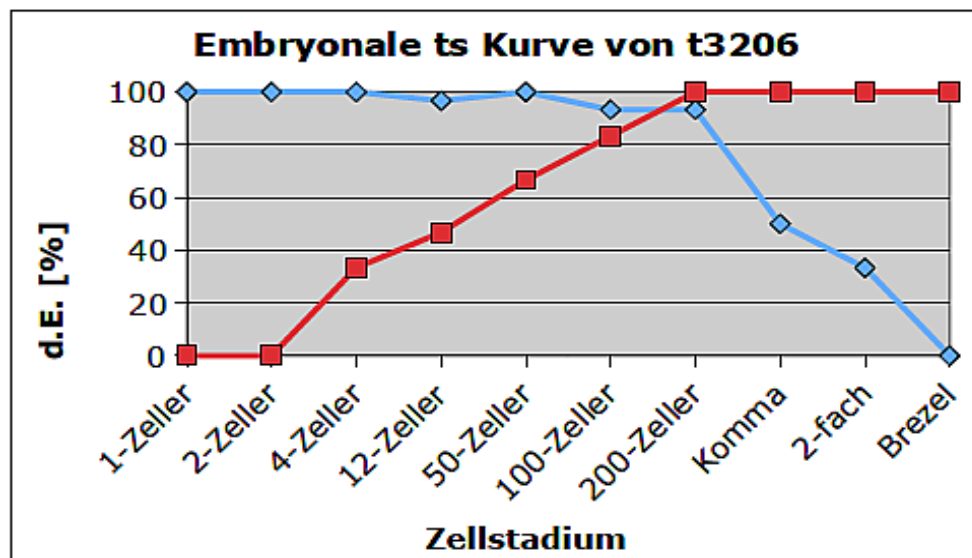


Abbildung 41: Embryonale ts-Kurve von *t3206*.

Die beiden Kurven (*up*- (rot) und *down-shift* (blau)) kreuzen sich zwischen dem 100- und 200-Zell-Stadium. Wenn man dann die Stadien vergleicht, in denen sowohl beim *up*- wie auch *down-shift* ein Effekt auftritt, kann man den Zeitraum, in dem das Genprodukt benötigt wird, in etwa zwischen das 50- und 200-Zell-Stadium ansetzen.

Ergebnisse

Zur Überprüfung, dass die Gewebe richtig differenziert sind (keine Schicksals-transformationen), wurden Antikörperfärbungen durchgeführt. Hierbei entschied ich mich die Standard-Färbungen für Hypodermis-Zellen, Muskelzellen, Darmzellen und Pharynx-Zellen durchzuführen. Da *C. elegans* eine invariante Zelllinie besitzt, sollte in Embryonen die zwar diskonfiguriert sind, jedoch mit korrekt differenzierten Geweben, die gleichen Zellzahlen wie der Wildtyp haben.

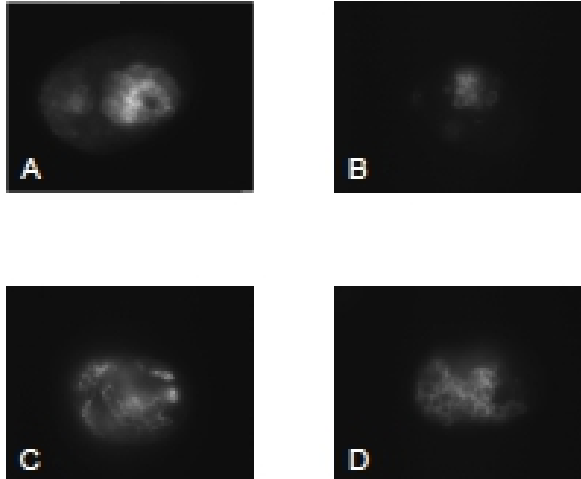


Abbildung 42: Antikörperfärbungen von *t3206*-Embryonen.

Die Färbung des Darms (A) mit ICB4 zeigt ein fehlplatziertes Darm-Cluster, dass allerdings die korrekte Anzahl an Zellen besitzt (20,2, \pm 0,92). Auch die Färbung des Pharynx-Clusters mit 3NB12 (B) zeigt, dass das Cluster die normale Größe hat (20,5, \pm 0,97), jedoch nicht in der vorderen Hälfte sondern relativ mittig im Embryo liegt. Die Hypodermis-Zellen (C) (gefärbt mit MH27) zeigen, dass die Haut zwar fast den kompletten Embryo umgibt, jedoch zwischendurch große Löcher zu erkennen sind. Abschließend wurden noch mit 5-6 die Muskelzellen angefärbt (D). Auch wenn sie komplett ungeordnet sind, sind es 79,3 (\pm 3,06) Zellen. Auch dieser Wert entspricht dem des Wildtyps. (n=10)

Die einzelnen Gewebe in *t3206* bilden keine Wildtyp-Strukturen (vgl. Abbildung 36), allerdings ergab die Auszählung der Zellzahlen, dass die Gewebe korrekt differenziert sind. *t3206* hat 79,3 (\pm 3,06; min: 72 max: 83) Muskelzellen, 20,2 (\pm 0,92; min: 19 max: 22) Darmzellen und 20,5 (\pm 0,97; min: 19 max: 21) Pharynx-Muskelzellen. Bei MH27 kann man sehen, dass die Haut nicht richtig um den Embryo gebildet wird, die Zellen jedoch fusionieren können. Dies führt wahrscheinlich dazu, dass die Embryonen sterben, da sie während der weiteren Entwicklung an mehreren Stellen aufplatzen, bzw. z.B. der Darm außen liegt.

Diese Ergebnisse und eine erste Zelllinien-Analyse mit bioinformatischer Auswertung der Falschlage der Zellen innerhalb des Embryos im Vergleich zum Wildtyp-Embryo (Abbildung 47 Embryo Nr. 1), sowie einer ersten Distanzkarte (Abbildung 43 Nr. 1), zeigten, dass zwar die Zellen innerhalb der Mutante falsch platziert sind, aber höchstwahrscheinlich keine Schicksalstransformation dafür verantwortlich ist. Dies unterstützt auch die Analyse des Zelltod-Musters aller fünf Embryonen, wo alle 14 frühen Zelltode (nach der 9. Zellteilungsrunde) korrekt in der Zelllinie auftauchen (Tabelle 7).

Ergebnisse

Tabelle 7: Analysen der Zelltod-Muster der fünf Zelllinien-Analysen von *t3206*-Embryonen.

Für alle fünf Embryonen konnte gezeigt werden, dass die apoptotischen Zellen alle ihr korrektes Schicksal haben und es wahrscheinlich keine regionalen Transformationen in *t3206*-Embryonen gibt. Dies schließt natürlich nicht die Transformation einzelner Zellen aus. +: Zelltod tritt auf (Vgl. Wildtyp), -: Zelltod tritt nicht auf (Vgl. Wildtyp), ?: nicht eindeutig zu bestimmen, ob Zelle apoptotisch ist.

Zelltod	Embryo 1	Embryo 2	Embryo 3	Embryo 4	Embryo 5
CD#1 (ala)	+	+	+	+	+
CD#2 (ala)	+	+	+	+	+
CD#3 (ala)	+	+	+	+	+
CD#4 (ala)	+	+	+	+	?
CD#5 (alp)	+	+	+	+	+
CD#6 (alp)	+	+	+	+	+
CD#7 (ara)	+	+	+	+	+
CD#8 (arp)	?	+	+	?	+
CD#9 (plp)	+	+	+	+	+
CD#10 (plp)	+	+	+	?	+
CD#11 (plp)	+	+	+	+	+
CD#12 (prp)	+	+	+	+	?
CD#13 (prp)	+	+	+	+	+
CD#14 (MS)	?	+	?	+	?

Es ist demnach wahrscheinlicher, dass die Zellen ihre korrekten Zellidentitäten haben, jedoch an eine falsche Position migrieren. Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurden weitere bioinformatische Analysen durchgeführt. Dazu wurden zunächst noch für vier weitere Embryonen komplette Zelllinien-Analysen erstellt. Dies war wichtig, um eine statistische Aussage über die Falschlagen der Zellen innerhalb mehrerer Embryonen zu gewinnen. Geht man davon aus, dass die Zellen ihre korrekte Zellidentitäten besitzen und nicht ihre korrekte Positionen erreichen können („desorientiert sind“), sollte die Fehl-Migration zufällig stattfinden und die Embryonen sich in der Falschlage der Zellen unterscheiden. Wie in den Abbildungen 43 – 46 gezeigt wird, sind alle fünf Embryonen höchst unterschiedlich. Vergleicht man die Differenzkarten mit der Differenzkarte zweier Wildtyp-Embryonen (siehe Einleitung), so ist sichtbar, dass sich die Embryonen der Mutante untereinander genauso unterscheiden wie auch zum Wildtyp-Konsensus (Abbildung 44 und 46). Dieses Ergebnis unterstützte die Hypothese, dass es sich bei *t3206* um eine Zellfokussierungsmutante handelt, da die Distanzkarten keine Muster erzeugen, die auf eine gerichtete Neuordnung der Zellen hindeuten würde. Das entstehende chaotische Muster kann als „Verirren“ der Zellen interpretiert werden.

Ergebnisse

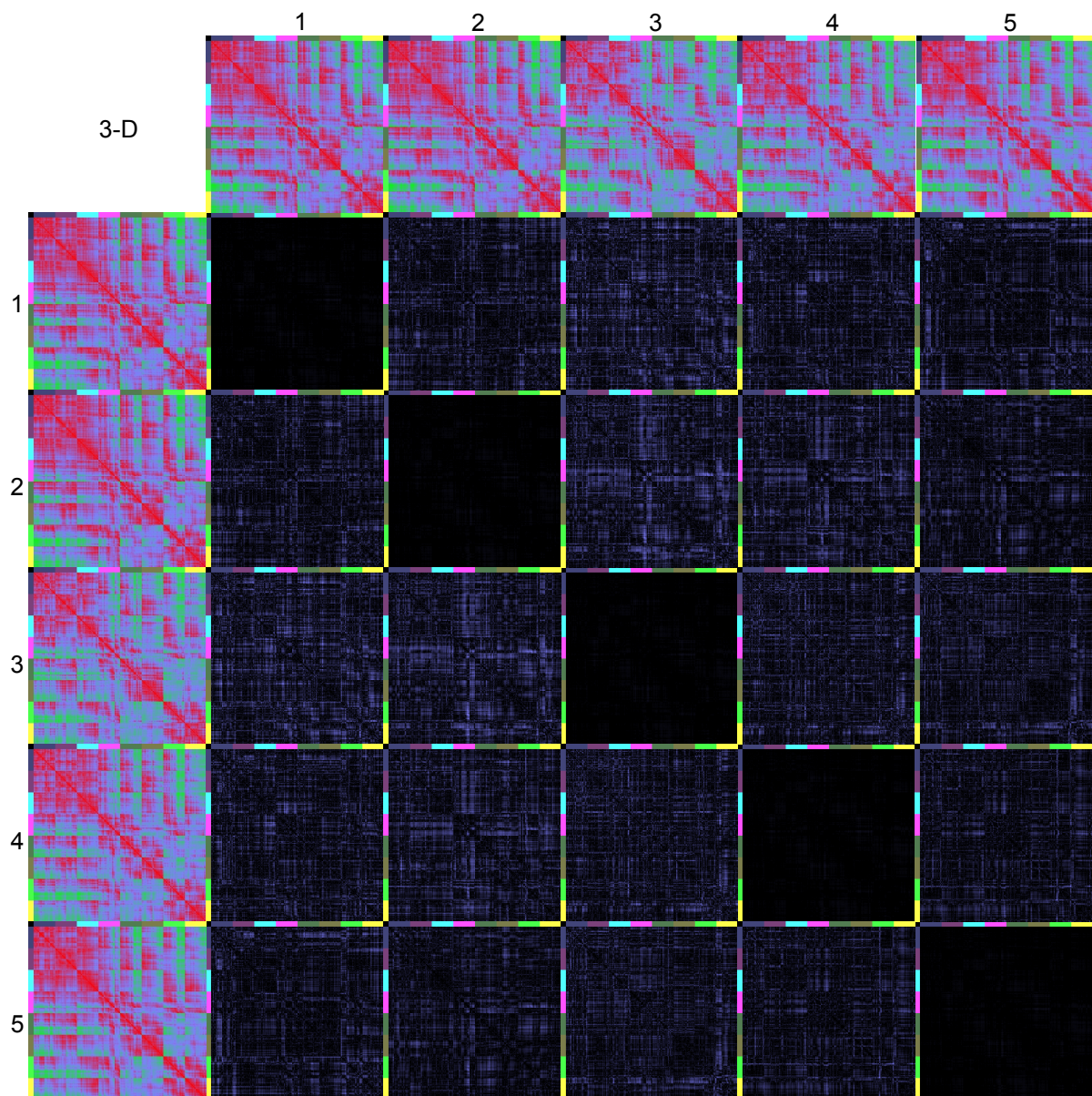


Abbildung 43: Alle fünf Distanzkarten der analysierten *t3206*-Embryonen gegeneinander mit 3D-Differenzkarten verglichen.

Wie auch schon der Vergleich der Differenzkarten von den fünf *t3205*-Embryonen (Abbildung 33) zeigte, gibt es kein Muster bei der Fehlplatzierung der Zellen innerhalb der einzelnen Embryonen.

- | | |
|--|---|
| 1) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, linker Embryo | 2) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, rechter Embryo |
| 3) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, linker Embryo | 4) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, rechter Embryo |
| 5) Aufnahme: AW_t3206_1, linker Embryo | |

Ergebnisse

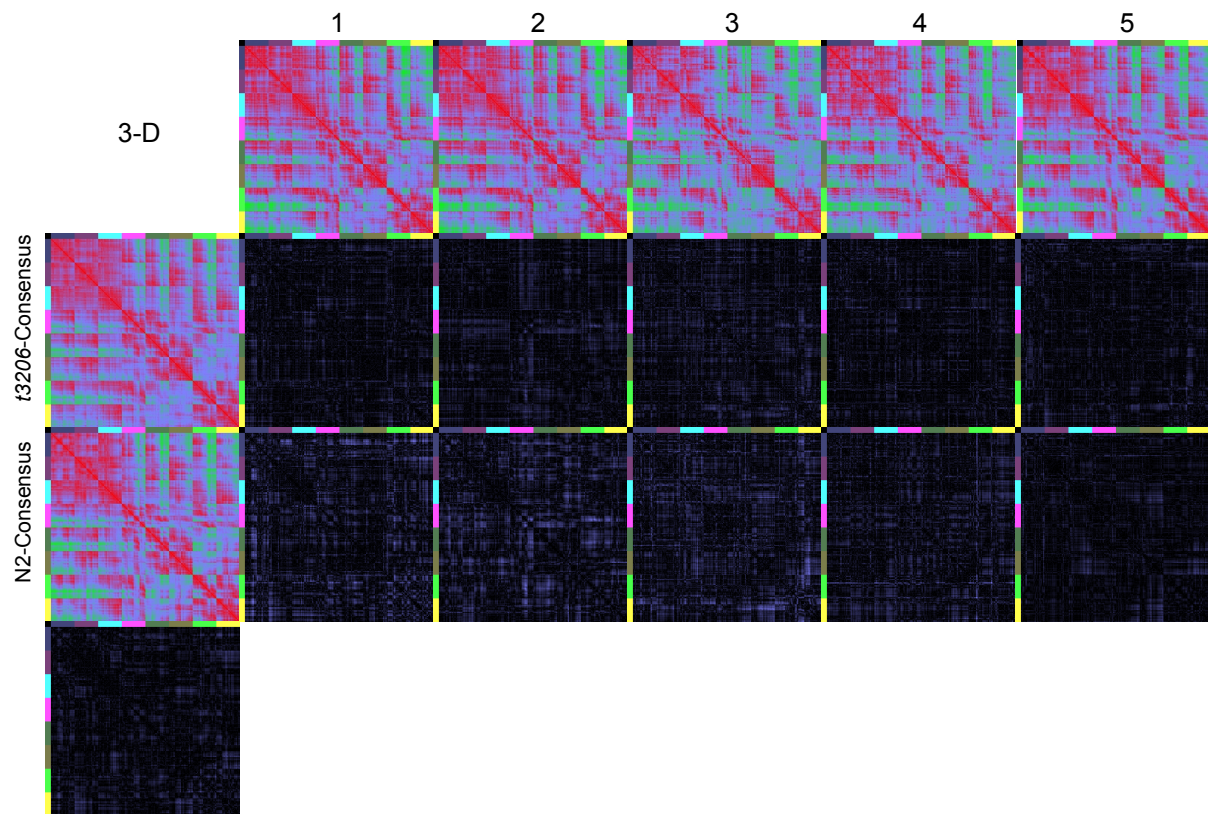


Abbildung 44: 3D-Distanz- und Differenzkarten von allen fünf *t3205*-Embryonen gegen den *t3205*- und Wildtyp-Konsensus.

Auch bei dem Vergleich der beiden Konsensus-Embryonen gegeneinander ist kein einheitliches Muster zu erkennen, dass auf eine Schicksalstransformation oder gerichtete Fehl-Migration hindeuten würde.

- 1) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, linker Embryo 2) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, rechter Embryo
- 3) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, linker Embryo 4) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, rechter Embryo
- 5) Aufnahme: AW_t3206_1, linker Embryo

Ergebnisse

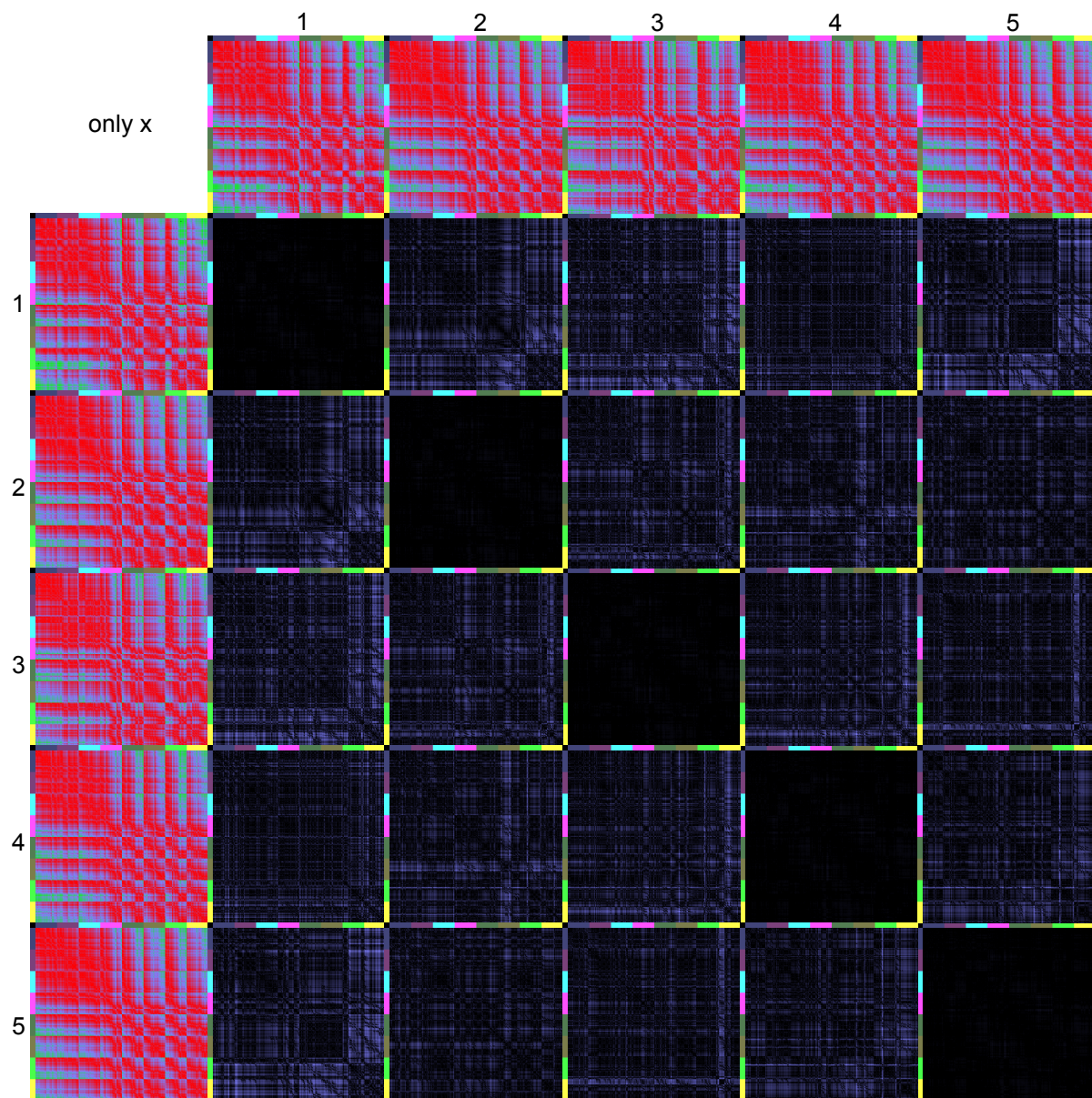


Abbildung 45: Alle fünf Distanzkarten der analysierten *t3206*-Embryonen gegeneinander mit only x-Differenzkarten verglichen.

Wie dieser Vergleich sehr schön verdeutlicht, unterscheiden sich alle fünf analysierten Embryonen stark voneinander. Es ist kein klares Muster zu erkennen.

- | | |
|--|---|
| 1) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, linker Embryo | 2) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, rechter Embryo |
| 3) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, linker Embryo | 4) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, rechter Embryo |
| 5) Aufnahme: AW_t3206_1, linker Embryo | |

Ergebnisse

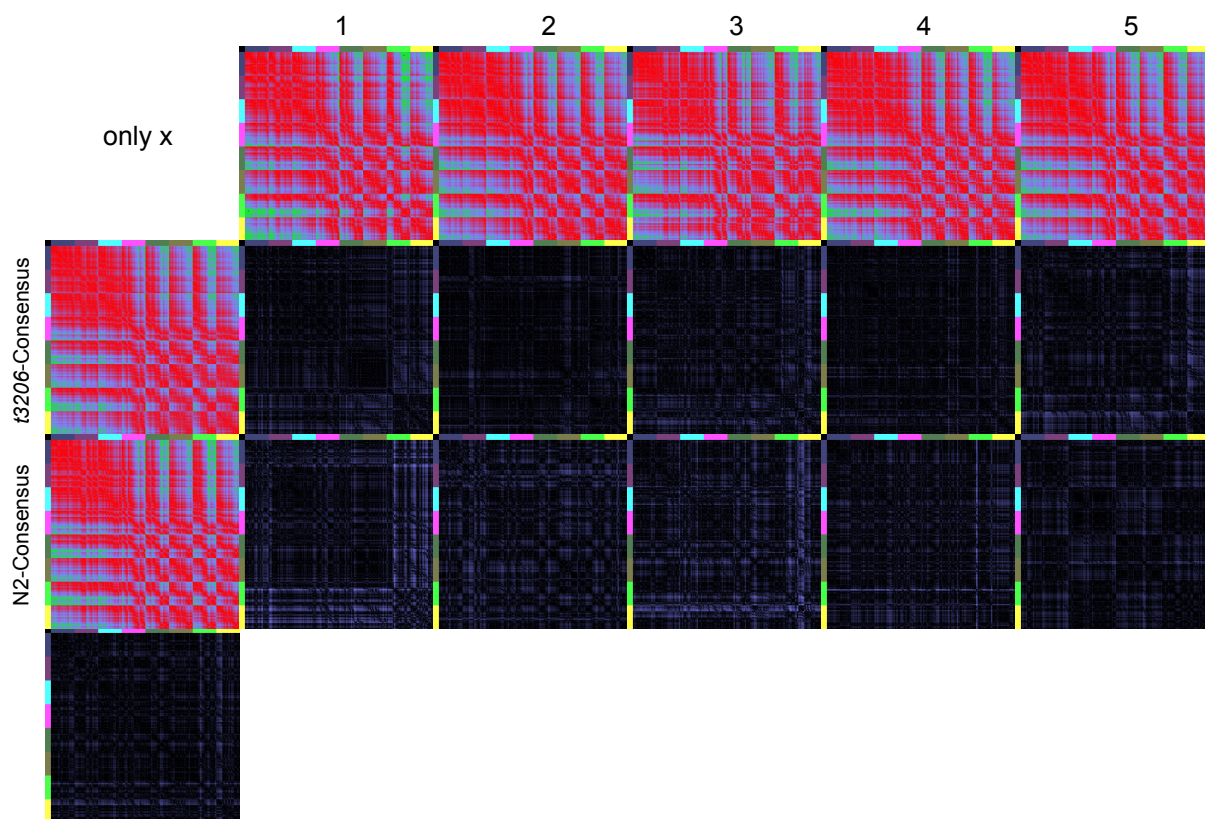


Abbildung 46: Alle fünf analysierten *t3206*-Embryonen im Vergleich zu dem Wildtyp-Konsensus-Embryo, sowie dem *t3206*-Konsensus-Embryo.

Der Vergleich der einzelnen Embryonen zu dem *t3206*-Konsensus-Embryo zeigt für jeden Embryo dessen individuelle Abweichung im Vergleich zu den anderen Embryonen. Im Vergleich zu dem Wildtyp-Konsensus-Embryo zeigt sich ein deutliche Verstärkung des Musters. Wie erwartet, sind die Differenzkarten zu dem Wildtyp-Konsensus-Embryo wesentlich abweichender (heller), als zum *t3206*-Konsensus-Embryo. Zieht man die beiden Konsensus-Karten voneinander ab, zeigt die resultierende Differenzkarte die gemeinsame Abweichung, die alle fünf Mutanten zum Wildtyp haben. Dies sind jeweils ein paar Zellen aus fast allen Regionen. Insgesamt ist die Karte relativ ähnlich (dunkel).

- 1) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, linker Embryo 2) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, rechter Embryo
- 3) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, linker Embryo 4) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, rechter Embryo
- 5) Aufnahme: AW_t3206_1, linker Embryo

Des weiteren konnte ein Konsensus-Embryo der Mutante (analog zum Konsensus-Embryo der Wildtypen) generiert werden. Dies ermöglicht es, die einzelnen Defekte der Embryonen zusammen zu fassen, und die sich daraus ergebenden gemeinsamen Defekte besser zu untersuchen. Da die Konsensus-Embryonen nur als Beträge der Distanzen der Mittelwerte mit Standard-Abweichung bestehen, ist es leider nicht möglich die Embryonen als 3-D-Repräsentationen darzustellen. Dies liegt daran, dass aus den Werten (als Beträge gerechnet) nicht erneut Koordinaten gewonnen werden können (pers. Kommunikation Christian Henning). Allerdings kann man eine Differenzkarte der beiden Distanzkarten erstellen. Diese Differenzkarte (Abbildungen 44 und 46) zeigt, dass essentiell *t3206* kein Problem in einer bestimmten Region hat. Bei dieser Methode sollte man jedoch bedenken, dass durch die große Unterschiedlichkeit der einzelnen *t3206*-Embryonen eine sehr hohe Standard-Abweichung besteht, da die Embryonen untereinander teilweise einen höheren RMS zueinander zeigen als zum Wildtyp. Dies

Ergebnisse

zeigt, dass die Variabilität der Falschlage der Zellen der *t3206*-Embryonen sehr hoch ist. Dieses Ergebnis unterstreicht die Vermutung, dass die Zellen zufällig falsch migrieren. Um dieses Problem besser zu verstehen, hat Christian Hennig die Methode der Falschlage der Zellen in der 3-D-Repräsentation und die Darstellung der Differenzkarten erweitert. Bisher wurden immer alle drei Distanzen der Koordinaten gemittelt und als Betrag dargestellt. Dabei kann man zwar sehen, dass eine Zelle falsch platziert ist, jedoch ist es nicht möglich zu erkennen, in welche Richtung sie abweicht. Es ist also bei dieser Methode möglich, dass immer wieder die selben Zellen betroffen sind. Jedoch kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Abweichung jedes Mal die Gleiche ist, oder die Zellen immer eine neue Falschlage erreichen. Um dieses Problem etwas transparenter zu gestalten, hat Christian das Programm erweitert, so dass nun die Abweichungen in der 3-D-Repräsentation und der Differenzkarte in einem Farbcode dargestellt werden. Dieser Farbcode setzt sich aus drei Farben für die drei Koordinaten zusammen: Blau=x-Richtung, Grün=y-Richtung und Rot=z-Richtung. Da die Zellen natürlich in alle drei Richtungen abweichen können, entstehen so Mischfarben aus allen drei Farben. Diese neue Methode mit dem Referenzembryo AWCH_N2_1 angewendet auf alle fünf *t3206*-Embryonen zeigt, dass die fünf Embryonen zwar teilweise Gemeinsamkeiten in den Regionen haben in denen Zellen falsch positioniert sind, jedoch kann man keine Übereinstimmungen in der Richtung der Fehlmigration erkennen (Abbildung 47). Übereinstimmend mit diesem Ergebnis zeigen auch die Differenzkarten die Defekte, die in der 3-D-Repräsentation auftauchen (Abbildung 48). Die Methode macht es meiner Meinung nach sogar einfacher 3-D-Repräsentation und Differenzkarten in Einklang zu bringen, da die spezifischen Einfärbungen der falschgelegenen Zellen bei dieser Methode denselben Farbcode benutzen. Diese Ergebnisse unterstreichen erneut die Variabilität der Mutanten untereinander und dass der Prozess zufällig sein muss. Überraschend war jedoch die Erkenntnis, dass es zwar einige braune Zellen (alle drei Farben gemischt) gibt, doch bei den meisten eingefärbten Zellen eine Farbe überwiegt. Dies führt zu weiteren Fragen, wie Zellmigration funktionieren könnte.

Ergebnisse

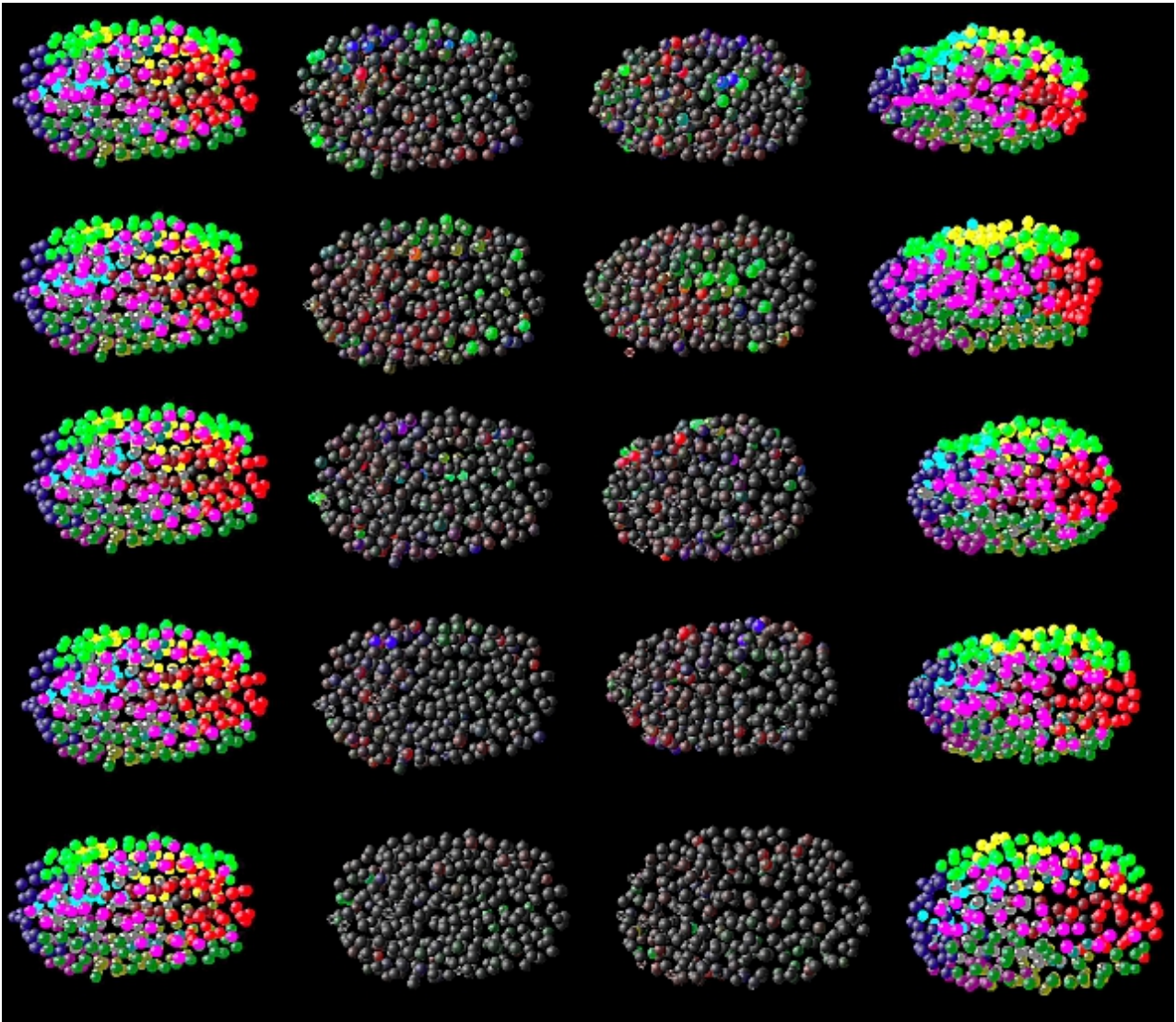


Abbildung 47: Vektorielle 3-D-Repräsentationen der Falschlage aller *t3206*-Embryonen gegen *AWCH_N2_1*. Auf der ganz linken Seite ist jeweils die 3-D-Repräsentation des Wildtyp-Embryos dargestellt, sowie auf der ganz rechten Seite der jeweilige *t3205*-Embryo. In der Mitte sind (links: Wildtyp, rechts: mutanter Embryo) die Zellen eingefärbt, die in ihrer Position im mutanten Embryo (im Vergleich zum Wildtyp) abweichen. Es werden beide Embryonen gezeigt, um eine Zuordnung der Zellen zu vereinfachen. Die Abweichungen der Zellen setzt sich aus den drei Farben (x = blau, y = grün und z = rot), die die jeweiligen Achsen definieren, zusammen. Dabei wird ersichtlich, dass der Fehlpositionierung der Zellen keine Gemeinsamkeiten zugrunde liegen.

Ergebnisse

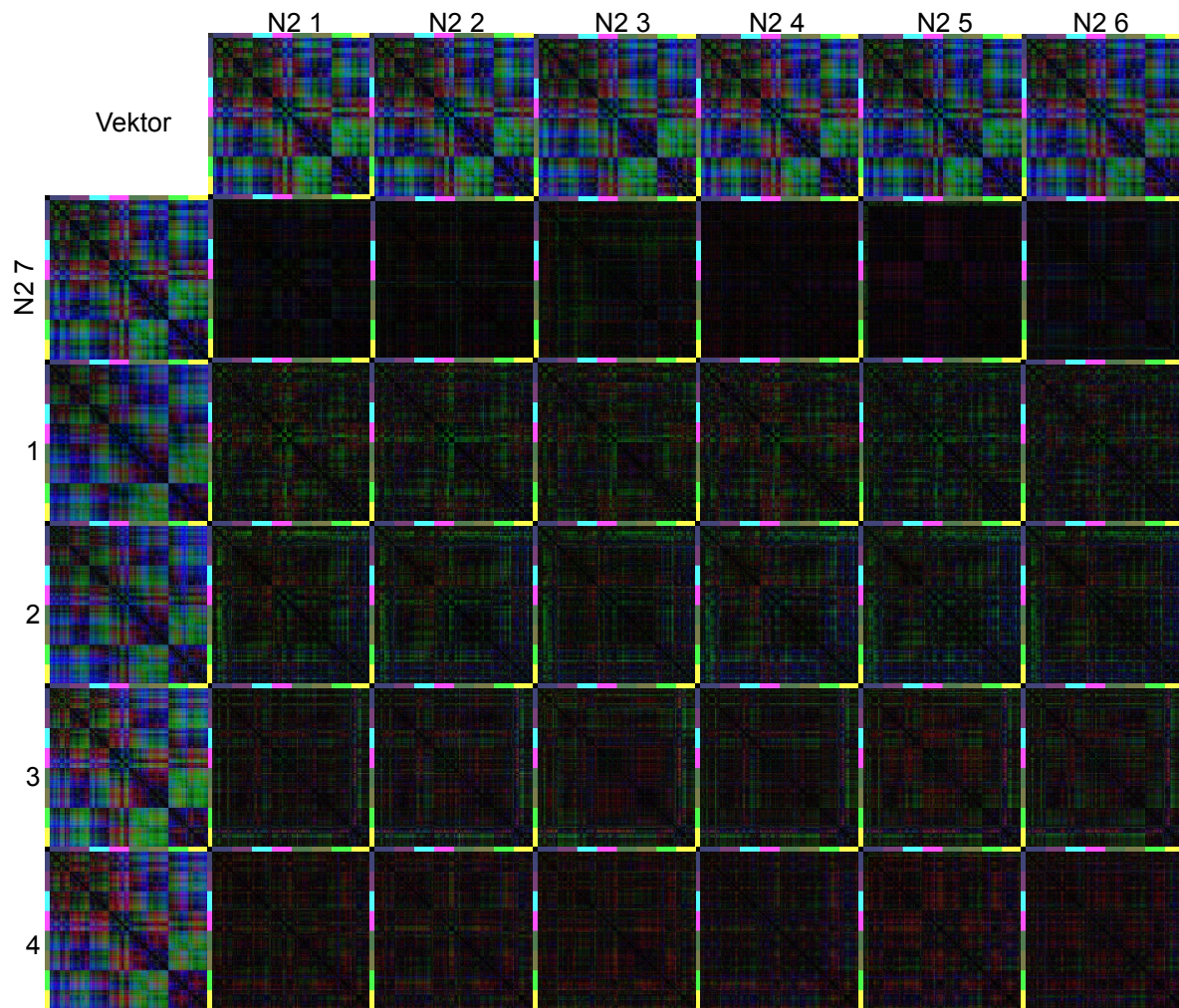


Abbildung 48: Vektor-basierte Distanz- und Differenzkarten von *t3206*-Embryonen im Vergleich zu individuellen Wildtyp-Embryonen.

In diesen Karten werden die Distanzen der Zellen zueinander in den einzelnen Achsen (x = blau, y = grün und z = rot) dargestellt. Da es hierzu noch keinen Konsensus-Embryo gibt, werden vier *t3206*-Embryonen (1-4) und ein Wildtyp-Embryo gegen sechs unterschiedliche Wildtyp-Embryonen verglichen. Bei dem Vergleich des Wildtypen zu den anderen Wildtypen fällt auf, dass die Karten relativ dunkel sind und die Abweichung auch innerhalb der Wildtypen schwankt. Im Vergleich dazu sind die *t3206*-Differenzkarten wesentlich heller. Allerdings ist zu beobachten, dass keine der vier Differenzkarten zu einem Wildtyp-Embryo irgendeine Ähnlichkeit aufzuweisen hätte. Dies spricht für eine zufällige Fehlpositionierung der Zellen.

- | | |
|--|---|
| 1) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, linker Embryo | 2) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, rechter Embryo |
| 3) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, linker Embryo | 4) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, rechter Embryo |

Da bei der Betrachtung der only x-Karten auffiel, dass auch eine Fehlpositionierung in Richtung der x-Achse (a-p-Achse) stattfindet, wurde eine weitere bioinformatische Methode angewandt. Mit dieser Methode werden sogenannte DDM-Karten berechnet und erstellt. Dabei wird die Position der AB-Zellen auf der a-p-Achse vom 12-Zellstadium bis in 256-AB-Zellstadium aufgezeigt. Der Farbkeil verläuft von grün (Zelle ist zu weit anterior) über schwarz (Zelle ist korrekt positioniert) hin zu blau (Zelle ist zu weit posterior). Vergleicht man die Wildtypen miteinander, kann man gut erkennen, welche Region in welchem Zellstadium noch ungeordnet ist. Wie nicht anders zu erwarten, gleichen sich die Karten der Wildtypen sehr (Abbildung 49).

Ergebnisse

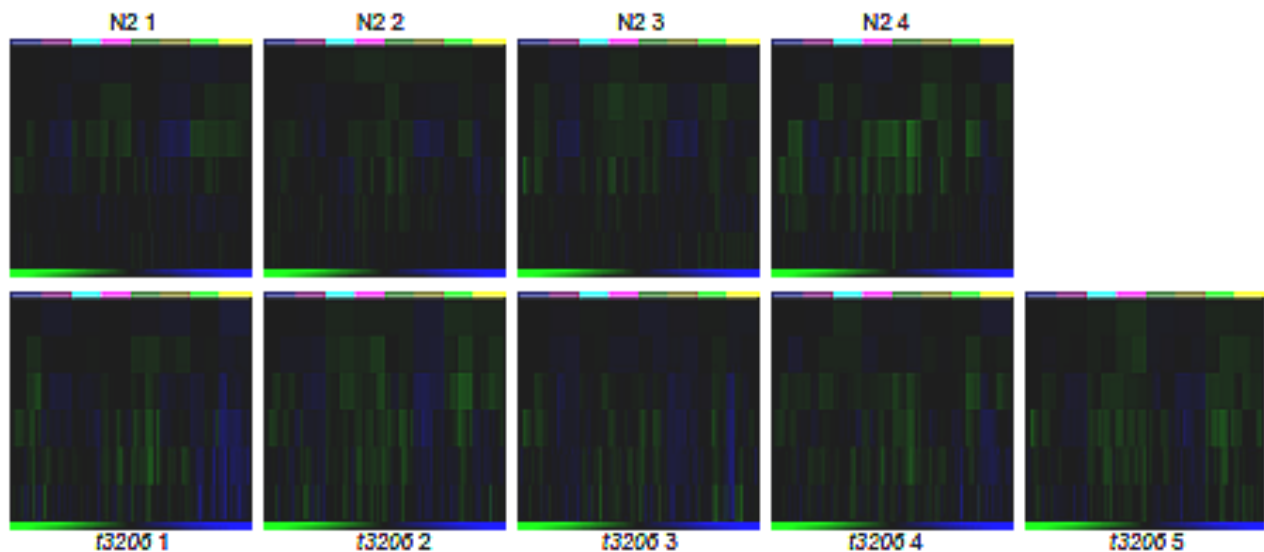


Abbildung 49: DDM-Karten von vier Wildtyp- und fünf *t3206*-Embryonen im Vergleich.

Wie man für die einzelnen Wildtyp-Embryonen sehen kann, findet eine Platzierung der Zellen auf der a-p-Achse ca. zwischen dem 16-AB- und 128-AB-Zellstadium statt. Im 256-AB-Zellstadium (unterste Reihe) befinden sich alle Zellen an ihrem Platz. Die Karte erscheint schwarz, da es weder eine Abweichung nach anterior (grün) noch posterior (blau) gibt. Im Gegensatz dazu scheinen die *t3206*-Embryonen auf der a-p-Achse ungeordneter zu sein (Karten sind bunter). Zudem fällt auf, dass auch noch im 256-AB-Zellstadium viele Zellen fehlplatziert sind.

Für N2:

- 1) Aufnahme: AW_CH_N2_Christ_1 2) Embryo 5
- 3) Aufnahme: RS_AK_Barcelona 4) Embryo 2

Für *t3206*:

- 1) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, linker Embryo 2) Aufnahme: AW_ND22H4a13_1, rechter Embryo
- 3) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, linker Embryo 4) Aufnahme: AW_ND22H4x2_1, rechter Embryo
- 5) Aufnahme: AW_t3206_1, linker Embryo

Im Gegensatz dazu sind die DDM-Karten von *t3206* farbiger und die Unordnung scheint bis ins prämorphogenetische Stadium hinein zu reichen. Dies erkennt man daran, dass in der letzten horizontalen Zeile blaue und grüne Farbkeile auftreten. Bei den Wildtypen hingegen ist diese Zeile schwarz. Das bedeutet für *t3206*, dass die Zellen an der a-p-Achse in der frühen Entwicklung eine größere Unordnung zeigen. Die Embryonen schaffen es nicht, diese Fehlpositionierungen bis ins prämorphogenetische Stadium zu kompensieren. Erstaunlicherweise wechselt das Muster von Zellstadium zu Zellstadium. Dies bedeutet, dass Bewegung innerhalb des Embryos stattfinden muss. Würde das Muster entstehen, weil einige Zellen sich nicht bewegen, würden diese durchgängig angezeigt werden. Dieses chaotische Verhalten der Zellen könnte der Grund sein, warum die Embryonen sterben, da mit Beginn der Morphogenese z.B. nicht alle Hypodermis-Zellen korrekt positioniert werden und somit die Haut instabil wird. Dies kann dazu führen, dass die Epidermis an einer oder mehr Stellen aufbricht.

Klonierung von *t3206*

Um die Mutante zu klonieren, wurde erstmals in unserem Labor die neue Sequenzieretechnik des Whole-Genome-Sequencing (WGS) erprobt. Das WGS beruht darauf, dass komplette Genome sequenziert werden können. Dies geschieht, indem die

Ergebnisse

Genome mehrere Individuen zusammengefasst und zerstückelt werden. Diese Stücke werden auf DNA-Chips (wie bei Microarrays) in (je nach Sequenzierer-Modell) 50bp-500bp langen Strängen sequenziert (Zhao, J. und Grant, S., 2011). Bei einer einfachen Sequenzierung einer unserer Proben wurde somit eine 40-fache Genom-Abdeckung erreicht. Das wirklich faszinierende dieser neuen Technik ist jedoch die bioinformatische Software, die aus den 50bp-500bp Fragmenten durch Vergleich mit einem Referenzgenom eine Genom-Sequenz generieren kann mit Abweichungen, die Punktmutationen entsprechen. Diese neue Technik zeigte relativ schnell überraschende Tatsachen. So konnte Oliver Hobert zeigen, dass vermeintlich isogenetische Würmer (bis zu 7x gegen den Wildtyp ausgekreuzt) sich in über 300 Varianten (30 Protein-codierenden Punkt-Mutationen) unterscheiden. Dies zeigte, dass ein homogenes „Wildtyp-Genom“ selbst im „isogenen Wurm“ nicht existiert und es nahezu unmöglich ist, bei diesem Ansatz eine bestimmte Mutation zu finden, die einen Phänotyp ausprägt. Aus dieser Überlegung hat Oliver Hobert einen weiteren Ansatz verfolgt, der das WGS mit dem konventionellen SNP-Mapping in *C. elegans* kombiniert (Doitsidou, M. et al., 2010).

Beim SNP-Mapping handelt es sich um eine Methode, bei der eine Mutation in *C. elegans* kartiert wird, indem in den Hawaii-Stamm CB4856 eingekreuzt wird. Diese beiden Stämme unterscheiden sich auf genomischer Ebene in ca. 18.684 SNPs (single-nucleotide-polymorphism) pro Chromosom. Diese Tatsache und die Erkenntnis, dass einige dieser SNPs innerhalb von Restriktionsschnittstellen liegen, macht es möglich, die DNA dieser beiden Stämme durch eine PCR bestimmter SNP-Bereiche und anschließend Restriktionsverdau des PCR-Produkts zu unterscheiden (auch snip-SNP-Mapping genannt). Kreuzt man die beiden Stämme zusammen, sollten nun in der F₁ 50% N2-Allel und 50% CB4856-Allel auftreten, was sich in dem Verhältnis der PCR-Produkte zwischen geschnitten und ungeschnitten in etwa widerspiegelt. Um nun eine Mutation zu kartieren, werden der mutante Stamm im N2-Hintergrund mit Hawaii zusammen gekreuzt. Da mit diesem Versuch herausgefunden werden soll, an welchen SNP die Mutation gekoppelt ist, müssen Würmer untersucht werden, die den Phänotyp behalten haben. Da es sich bei unseren Mutationen um rezessive Allele handelt, prägen sich die Phänotypen erst wieder in der F₂-Generation aus. Die Nachkommen mit Phänotyp werden zusammengefasst, die snip-SNP-Fragmente für alle Chromosomen amplifiziert und anschließend verdaut. Als Kontrolle wird DNA von Nachkommen zusammengefasst, die den Phänotyp nicht ausgeprägt haben. Die Mutation sollte an den SNP gekoppelt sein, der eine Verschiebung in Richtung des N2-Allels zeigt. Durch Wiederholung des Mappings für unterschiedliche SNPs, kann dann der Bereich in dem die Mutation liegt nach und nach eingegrenzt werden (Wicks, S., et al., 2001).

Da heutzutage in einer Sequenz relativ einfach nach SNPs gesucht werden kann, hat Oliver Hobert die Methoden dahingehend kombiniert, dass die Kreuzung und die Zusammenfassung der F₂-Generation mit Phänotyp durchgeführt wird. Jedoch wird anstelle der Suche mittels PCR die vereinigte DNA komplett sequenziert und in der Endsequenz nach Bereichen mit SNPs gesucht, die eine signifikante Verschiebung des 1:1-Verhältnisses in Richtung N2-Sequenz zeigen. Es ist auch keine Sequenzierung der Würmer ohne Phänotyp-Ausprägung notwendig, da das Referenzgenom genutzt wird.

Da uns dieser Ansatz am Erfolg versprechendsten erschien und die vorherigen WGS-Sequenzen ein SNP-Mapping notwendig erscheinen ließen, habe ich die SNP-Kreuzung durchgeführt und die isolierte DNA zur Sequenzierung nach New York, Columbia

Ergebnisse

University an Oliver Hoberts Labor geschickt. Als Ergebnis bekam ich unter anderem eine Excel-Tabelle zugeschickt, die die Daten für alle bekannten SNPs beinhaltet (Abbildung 50).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	id	dna	start	snp_name	snp_base	snp_reads	ref_base	wt_reads	read_depth	sample_reads	
2	10277218	I	6061594	bsP1	t	2	G	34	36	@.....T.....t	
3	10277080	I	6045833	bsP2	c	1	T	35	36	@.....C.....	
4	10277018	I	6033941	bsP3	a	2	G	41	43	@.....a.A.....	
5	10277088	I	6046864	bsP4	c	1	A	43	44	@.....C.....	
6	10285748	III	11494543	bsP5	g	25	C	21	47	@..gggg.g.Ggg.g..g.gG..gg	
7	10411726	I	3406534	CE1-9	t	2	G	27	29	@T.....T.....	
8	10299698	I	6623737	CE1-15	t	1	C	49	51	@.....T..A..	
9	10367122	I	7410352	CE1-28	c	3	T	49	52	@.....C...C...C.....	
10	10323751	I	4338253	CE1-123	g	2	A	39	43	@.....C.....G...	
11	10297365	I	6593043	CE1-144	c	1	G	44	45	@.....C.....	
12	10281111	I	6166277	CE1-145	t	3	A	52	56	@.....Ct.....t...	
13	10343362	I	4078434	CE1-146	c	1	T	31	32	@...C.....	
14	10438081	I	2759960	CE1-147	c	0	A	43	44	@.....G.....	
15	10386289	I	7899293	CE1-149	g	0	T	42	42	@.....C.....	
16	10389170	I	3806109	CE1-150	a	2	T	32	35	@a...G...A.....	
17	10271233	I	5083461	CE1-151	t	0	A	63	65	@.....C..C.....	
18	10423158	I	2852467	CE1-152	g	1	A	12	13	@..G.....	
19	10396924	I	8158558	CE1-153	a	2	G	48	50	@.....a..a.....	
20	10402363	I	8550709	CE1-154	c	2	T	56	60	@.....G.C.....C.....	
21	10337274	I	6991345	CE1-155	c	2	T	35	37	@.....C..c.....	
22	10358694	I	195311	CE1-156	g	7	A	17	24	@...G.G...g...gG	
23	10406394	I	8828147	CE1-157	c	2	T	41	43	@.....C.....	
24	10402932	I	8642732	CE1-158	a	0	T	31	31	@.....C.....	
25	10350365	I	884391	CE1-159	g	10	T	32	43	@g...G...g...g.gg..c..	
26	10367968	I	7492494	CE1-160	g	0	A	48	49	@.....C.....	

Abbildung 50: Ausschnitt aus den Rohdaten des WGS zu der SNP-Verteilung in *t3206*.

In Spalte A ist jeder Punkt-Mutationen eine Nummer zugeordnet. Spalte B und C geben das Chromosom und die genaue Lokalisierung der betroffenen Base an. In Spalte D wird der Name des Snps angegeben, z.B haw für Hawaii-Allel. In Spalte E (SNP) und G (N2) sind jeweils die auftreten Basen benannt, sowie in Spalte F (SNP) und H (N2) die Anzahl, wie häufig diese jeweilige Variante sequenziert wurde. Spalte I gibt an, wie hoch die Abdeckung ist (Spalte F und H addiert). In Spalte J werden die einzelnen Sequenzdaten aufgelistet. Man erkennt, dass einige Stellen im Genom eine geringe Abdeckung haben als andere (z.B Zeile 18 nur 13 mal sequenziert). Im Durchschnitt wird eine 40x fache Genom-Abdeckung erreicht.

Weitere Tabellen enthielten, ähnlich wie die SNP-Tabelle, alle Punkt-Mutationen, die in dem Genom gefunden wurden und daraus gefilterte Mutationen, die nur noch die Protein-codierenden Varianten und ncRNAs betrafen (Abbildung 51).

Ergebnisse

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T			
1	id	mutant	cdna	slat	length	reference	sample	consensus	loci	multi	mapping	neighbor	number	number	sequencing	sample	variant	indel	size	class	description	parent	features
6	5	ND22H4_01		84762	1	A	T	48	0,62	63	34	0	42	42	@TTTTTT	point	0	missense	AAA->TAA	Y48G1C.10			
10	19	ND22H4_01		232041	1	G	A	7	1	63	0	0	2	2	@AA	point	0	missense	TCC->TTC	Y48G1B.6			
11	20	ND22H4_01		232042	1	A	G	7	1	63	0	0	2	2	@GG	point	0	missense	TCC->CCG	Y48G1B.6			
20	53	ND22H4_01		361325	1	C	A	43	0,69	63	26	0	37	37	@AAAAA	point	0	missense	AAG->AAT	R119.1			
83	204	ND22H4_01		947286	1	C	T	13	0,5	63	2	0	2	2	@T	point	0	missense	CCT->CTC	Y95B8A.1			
84	205	ND22H4_01		947287	1	C	T	2	0,5	63	2	0	2	2	@G	point	0	missense	CCT->CTT	Y95B8A.1			
104	260	ND22H4_01		1142103	1	C	A	52	0,5	63	38	0	42	42	@AAAAA	point	0	missense	GGT->TGT	Y48G8AL.10			
107	263	ND22H4_01		1175715	1	C	T	24	0,89	63	24	10	45	55	@TTTTTT	point	0	missense	AGC->AAT	Y48G8AL.11			
155	371	ND22H4_01		2379643	1	C	T	49	0,75	63	24	0	33	33	@TTTTTT	point	0	missense	ATG->ATA	Y39G10AR.17			
165	376	ND22H4_01		2504051	1	T	G	7	0,5	63	6	0	2	2	@GG	point	0	missense	GTT->GGT	Y23H5B.5			
169	390	ND22H4_01		2668251	1	T	C	26	0,69	63	26	7	28	35	@C.C.C.C	point	0	missense	GTT->GCT	F32B5.5a.F32B5			
199	470	ND22H4_01		3670154	1	C	T	29	0,69	63	24	2	49	51	@TTTTTT	point	0	missense	GTT->ATT	Y47G6A.23			
203	492	ND22H4_01		3670537	1	C	T	30	0,69	63	28	3	54	57	@TTTTTT	point	0	missense	GAA->AAA	D1037.2			
205	500	ND22H4_01		3821943	1	C	T	46	0,62	63	28	0	41	41	@TTTTTT	point	0	missense	none	F53F10.7			
225	519	ND22H4_01		4056738	1	C	T	36	0,62	63	32	3	38	41	@TTTTTT	point	0	missense	CCG->CTC	C09D1.1a.C09D			
239	537	ND22H4_01		4306794	1	C	T	33	0,5	63	30	0	51	51	@TTTTTT	point	0	missense	CAC->TAO	Y47D9A.1a.Y47D			
305	712	ND22H4_01		5522848	1	G	A	26	0,56	63	22	2	47	49	@AAAAA	point	0	missense	CCT->CTC	F59A3.8			
317	725	ND22H4_01		5775279	1	C	T	22	0,5	63	34	1	26	27	@TTTTTT	point	0	missense	GCT->GTP	B0414.3			
387	788	ND22H4_01		7043813	1	C	T	36	0,62	63	30	1	44	45	@TTTTTT	point	0	missense	CCA->CTA	F15C11.1.F15C			
393	798	ND22H4_01		7301404	1	C	G	56	0,44	63	38	0	30	30	@GGGGG	point	0	missense	GGC->GCT	F13G3.5a.F13G3			
406	804	ND22H4_01		7503723	1	C	T	33	0,56	63	50	2	31	33	@TTTTTT	point	0	missense	GGA->GAT	C26C6.8			
458	861	ND22H4_01		7987986	1	C	T	13	0,5	63	10	2	51	53	@TTTTTT	point	0	missense	CCT->CTC	H05L14.2			
460	862	ND22H4_01		8038746	1	C	T	42	0,81	63	12	0	43	43	@TTTTTT	point	0	missense	GAT->AAT	K04G2.5			
515	910	ND22H4_01		8492534	1	C	T	27	0,56	63	30	3	53	56	@TTTTTT	point	0	missense	CCG->CTC	D1081.8			
524	916	ND22H4_01		8525622	1	T	C	8	0,75	63	6	1	28	29	@CCCCC	point	0	missense	ACC->GCT	F43G9.8a.F43G9			
525	917	ND22H4_01		8651310	1	G	A	28	0,69	63	34	4	58	62	@AAAAA	point	0	missense	AGA->AAA	F39H2.2a.F39H2			
526	918	ND22H4_01		8663761	1	T	C	41	0,62	63	24	0	53	53	@CCCCC	point	0	missense	GAC->GGT	F39H2.4			
534	937	ND22H4_01		8846508	1	C	T	30	0,69	63	30	2	40	42	@TTTTTT	point	0	missense	AGA->AAA	F29D10.4			
535	938	ND22H4_01		8962847	1	G	A	21	0,69	63	20	2	67	69	@AAAAA	point	0	missense	GCT->ACT	F32H2.1a.F32H2			
557	966	ND22H4_01		9241846	1	C	T	33	0,56	63	34	1	42	43	@TTTTTT	point	0	missense	GGG->GAT	F36H2.1a.F36H2			
559	967	ND22H4_01		9246865	1	C	G	50	0,82	63	36	0	55	55	@GGGGG	point	0	missense	CGT->CCG	F39H2.2			
561	968	ND22H4_01		9246866	1	G	C	52	0,62	63	36	0	55	55	@CCCCC	point	0	missense	CGT->GGT	F39H2.2			
583	975	ND22H4_01		9699160	1	T	C	56	0,75	63	38	0	47	47	@CCCCC	point	0	missense	AAT->AGT	C04F12.8			
603	1076	ND22H4_01		10199806	1	C	T	51	0,5	63	26	0	33	33	@TTTTTT	point	0	missense	GAA->AAA	Y106G8E.1			
635	1239	ND22H4_01		10465920	1	C	T	28	0,69	63	28	5	48	53	@TTTTTT	point	0	missense	GGA->GAT	Y106G8H.12			
638	1246	ND22H4_01		10630341	1	C	T	39	0,62	63	32	2	39	41	@TTTTTT	point	0	missense	ATG->ATA	B0511.13			
665	1363	ND22H4_01		11145687	1	T	G	11	0,5	63	0	0	2	2	@aa	point	0	readthrough	TAA->GAA	ZK39.9			
669	1370	ND22H4_01		11149181	1	G	C	15	0	63	8	0	2	2	@cc	point	0	missense	GCA->CCA	ZK39.2			
ND22H4_012111_0 flat																							
Table 1 / 1																							
PageStyle_ND22H4_012111_0 flat																							
STD												Summe=0											
669																							

Abbildung 51: Ausschnitt aus der Excel-Tabelle aller Protein-codierende und ncRNA- Mutationen für *t3206*.

Die Tabelle ist wie die Tabelle für die SNP-Verteilung aufgebaut, allerdings enthält sie zusätzlich noch Informationen zu dem betroffenen Gen (T) und um was für eine Mutation (missense, splice-acceptor,..) es sich handelt (R und S).

Auf den ersten Blick ist die Tabelle unübersichtlich. Da ich Daten für alle Chromosomen zugeschickt bekommen habe, kann ich die Aussage treffen, dass nach zweimaligen Auskreuzens und einmaligen Einkreuzens in CB4856 im Schnitt pro Chromosom 37 Protein-codierende Mutationen auftreten. Diese Zahlen zeigen deutlich, dass Genome wesentlich „flexibler“ sein müssen, als bisher angenommen.

Aufgrund einer kleinen, mitgeschickten Anleitung im Interpretieren der SNP-Daten konnte ich die Parameter zur Eingrenzung meiner Mutation setzen. Diese Interpretation lokalisierte *t3206* auf Chromosom I. Allerdings findet man bei diesen Parametern, dass sich zwei relative kleine Bereiche auf Chromosom I bilden (Mitte bei ca. 7,04 Mbp/1,66 cM und rechtes Chromosomen Ende 14,53 Mbp/25,79 cM). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eventuell zwei Mutationen aneinander gekoppelt sind und diesen Phänotyp verursachen. Diese Variante erschien uns aber relativ unwahrscheinlich, da der zweimal ausgekreuzte Stamm beim SNP-Mapping bei 1000 vereinzelt F₂-Würmern nahezu perfekt zu 22,28% in eine ts-Mutante segregierte. Nimmt man nun an, dass dem Phänotyp zwei ca. 7,49 Mbp/24,13 cM auseinander liegende Mutationen zugrunde liegen, hätte man eine Rekombinationswahrscheinlichkeit von fast 1/4. Diese würde dazu führen, dass die ts-Quote reduziert sein müsste und bei maximal 18,75% liegen sollte, sollte der Phänotyp synthetisch sein.

Ein weiterer Versuch unterstützt die Theorie, dass die *t3206* in der Mitte von Chromosom I liegen sollte, da zeitgleich zum WGS noch DNA von nicht-ts F₂-Nachkommen isoliert wurde, um als Kontrolle für die neue Methode auch noch ein konventionelles snip-SNP-Mapping durchzuführen. Hierzu wurden zuerst für die Chromosomen I und II jeweils drei snip-SNPs getestet. Die drei snip-SNPs sind so ausgesucht, dass sie jeweils relativ das linke Ende, die Mitte und das rechte Ende eines Chromosoms abdecken, damit man

Ergebnisse

zuerst eine grobe Lokalisierung auf einem Chromosom hat (Wicks, S., et al., 2001).

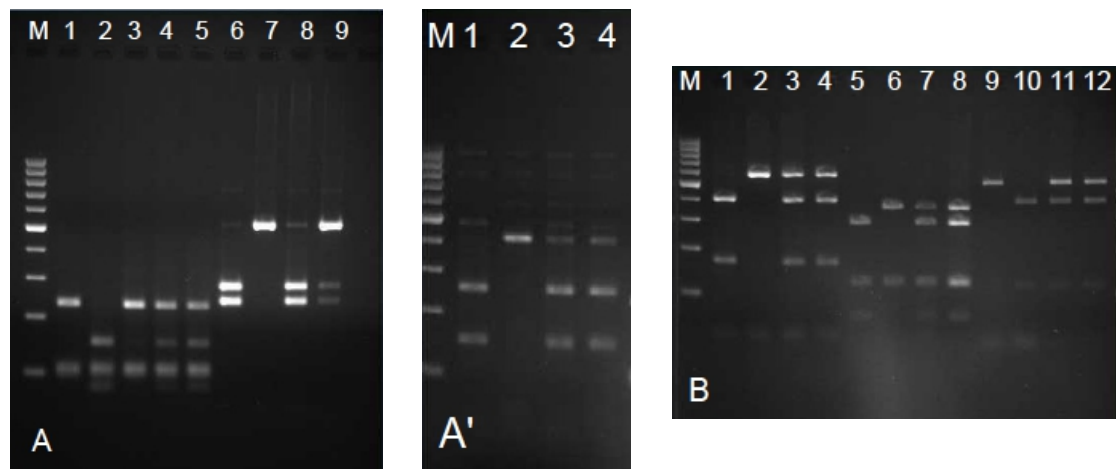


Abbildung 52: Agarosegele des SNP-Mappings für *t3206*.

In (A) und (A') sind die drei snip-SNPs für Chromosom I aufgetragen, während in (B) als Vergleich alle drei snip-SNPs von Chromosom II aufgetragen sind. Für jeden snip-SNP wurde jeweils zuerst der Verdau des N2-PCR-Produkts, gefolgt von CB4856, den ts-Würmern und zuletzt die Nicht-ts-Würmer, aufgetragen. Für den snip-SNP auf der Mitte von Chromosom I ((A) Taschen 1-5) wurde zudem noch ein Verdau aufgetragen, bei dem als template-DNA für die PCR ein 1:1-Gemisch der N2- und CB4856-DNA genutzt wurde. In Bild (B) sieht man für alle SNPs ein 1:1-Verhältnis von N2- zu CB4856-Allel, da die Banden in etwa gleich stark sind. Dies bedeutet, dass die ts-Mutation nicht an Chromosom II gekoppelt ist. Im Gegensatz dazu ist in Bild (A) für den mittigen SNP (Taschen 1 - 5) auf Chromosom I eine eindeutige Kopplung zu erkennen, da nur das N2-Allel amplifiziert wurde (Tasche 3). Der SNP auf dem linken Chromosomen-Arm (A') ist nicht an die ts-Mutation gekoppelt. Dahingehend ist die Auswertung des Verdau für den SNP auf dem rechten Chromosomen-Arm ((A) Taschen 6 - 9) nicht eindeutig, da die ts-Würmer eine Verschiebung des Verhältnisses in Richtung N2-Allel zeigen (Tasche 8). Die Nicht-ts-Würmer hingegen zeigen eine Verschiebung in Richtung des CB4856-Allels.

In Abbildung 52 sind die jeweils drei snip-SNP-Verdaue für Chromosom I und II gezeigt. Als Vergleich wurde jeweils das verdaute PCR-Produkt von N2 und Hawaii als Kontrolle aufgetragen. Dann folgen die PCR-Produkte von der *template*-DNA der ts Würmer und der nicht ts Würmer. Ist die ts Mutation nicht an den snip-SNP gekoppelt, sollten bei nicht-ts und ts jeweils ca. ein 1:1-Verhältnis des N2 und Hawaii-Allels sein (Abbildung 52, A' und B). Auf Chromosom II (Abbildung 52, B) sind keine Unterschiede zwischen nicht ts und ts zu sehen. Bei Chromosom I hingegen ist deutlich eine Verschiebung in Richtung des N2-Allels bei dem mittleren snip-SNP (pkP1097 4,6 Mbp) zu erkennen. Dies bedeutet, dass die ts Mutation relativ mittig auf Chromosom I liegt. Der Verdau des rechten snip-SNPs ist mehrdeutig (Abbildung 52, A Taschen 6 – 9). Sieht man den Verdau des PCR-Produkts der zusammengefassten ts-Würmern, so sieht es auch nach einer Kopplung an diesen SNP aus. Jedoch ist eine schwache Bande bei ca. 550 bp zu erkennen. Dies könnte bedeuten, dass etwas Rekombination stattgefunden hat und dies das CB4856-Allel ist. Allerdings könnte es auch einfach auf einen partiellen Verdau hindeuten. Bei dem Verdau des PCR-Produkts der zusammengefassten nicht ts-Würmer ist jedoch eine Verschiebung des Verhältnisses in Richtung des CB4856-Allels zuerkennen. Da dies genetisch nicht einfach zu erklären ist, ist auch hier eine mögliche Erklärung, dass der

Ergebnisse

Verdau nur partiell war. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass das Ergebnis für diesen snip-SNP-Verdau mehrere Male reproduzierbar war. Eine weitere Überlegung ist, dass *sem-4* bei ca. 8 Mbp liegt und somit relativ mittig zwischen beiden SNPs (ca. 4 Mbp zu dem in der Mitte und ca. 6 Mbp zu dem am rechten Ende). Somit könnte die Mutation auch an beide SNPs gekoppelt sein. Insgesamt betrachtet decken sich die Daten mit den Daten des *Whole Genome Sequencing*, welches detailliertere Ergebnisse ergab. Auf Grund dessen wurde darauf verzichtet den Verdau ein weiteres Mal zu wiederholen, bzw. einen benachbarten snip-SNP zu testen.

Die WGS-Daten zeigten die Verteilung der SNPs für Chromosom I eine Abweichung des 1:1-Verhältnis (Parameter 0,2 – 0,6) von ca. 2 Mbp bis ans rechte Ende. Dies ist ein extrem großer Bereich innerhalb dessen die Bereiche gesucht wurden, die überhaupt keine Rekombination zeigen. Vergleicht man diese Daten mit denen der anderen Chromosomen, ist es erstaunlich, wie wenig SNPs in die Auswertung noch einbezogen wurden. Für Chromosom I wurden 995 SNPs von 16.060 SNPs berücksichtigt, wohingegen für Chromosom II z.B. 15.541 SNPs von 19.574 SNPs einbezogen wurden.

Um diese Ergebnisse nun *in vivo* zu bestätigen, wurde versucht die Mutante per ballistischer Transformation (diese Methode wird im Weiteren als Schießen bezeichnet) zu komplementieren (Wilm, T. et al., 1999).

Bei diesem Ansatz habe ich 48 mal auf *t3206* geschossen. Nach den ersten acht Schuss (ein paralleler Ansatz) mit dem Fosmid WRM067bE10, interpretierte ich zwei Linien als gerettet, wovon eine Linie vier Wochen stabil wachsen konnte, dann jedoch zusammenbrach. Diese Schüsse unterschieden sich von einem zweiten, zeitgleich durchgeführten Versuch mit einem anderem Fosmid WRM0635B10. Dieses Fosmid enthielt die DNA für das zweite Kandidaten-Gen C26C6.8. Diese Schüsse ergaben, dass zehn vereinzelte geschlüpfte Larven nicht in der Lage waren, Nachkommen zu produzieren und so eine stabile Linie zu etablieren. Aufgrund der weniger überzeugenden Ergebnisse wurde im weiteren versucht *t3206* mit Fosmid-DNA zu retten (Tabelle 8). Da die Ergebnisse nicht reproduzierbar waren, wurde beschlossen als Kontrolle ein Marker-Plasmid pPD118.33ΔΔmCherry (abgekürzt pPD) zu ko-transformieren. pPD enthält die Sequenz für das Fluoreszenzprotein *mCherry* unter der Kontrolle des *myo-2D*-Promotors. Mit pPD transformierte Würmer erkennt man sehr leicht daran, dass sie unter einem Fluoreszenz-Binoskop einen rot leuchtenden Pharynx zeigen, da der *myo-2D*-Promotor spezifisch im Pharynx-Muskel exprimiert wird. Dieser Ansatz hatte den Vorteil, dass man die Transformationsrate bestimmen kann, wenn man einen Teil der beschossenen Würmer bei der permissiven Temperatur (15°C) wachsen lässt.

Ergebnisse

Tabelle 8: Auflistung der Schüsse auf *t3206* zur Komplementation der Mutation.

In der Liste sind jeweils der transformierte Stamm, die Anzahl der Schüsse pro Experiment, die verwendete DNA mit dem darauf befindlichen Gen und das Datum der Durchführung angegeben. Des weiteren wird angegeben, ob mit einem Marker (und der verwendeten Menge) ko-transformiert wurde. In den letzten beiden Spalten ist die Auswertung der Schüsse in Form von stabilen Linien angegeben, die bei 15°C oder 25°C (je nach Durchführung) etabliert werden konnten. Die Aufsummierung der Experimente am Ende der Liste zeigt, dass *t3206* sich nicht transformieren lässt.

Stamm	Anzahl Schüsse	Fosmid/ Cosmid/ YAC	Gen	Datum	pPD	Stabile Linien 15°C (F₁ vereinz.)	Stabile Linien 25°C (F₁ vereinz.)
<i>t3206</i>	8	-	-	05.02.11	16 µg	0 (70F1)	-
<i>t3206</i>	8	WRM067 bE06 16µg	<i>sem-4</i>	15.02.11	-	-	2 (4 F1) nach 1 Monat zusammen gebrochen
<i>t3206</i>	8	WRM063 5dB10 16µg	C26C6.8	15.02.11	-	-	0 (1 F1) „seltsam“
<i>t3206</i>	8	WRM067 bE06 16µg	<i>sem-4</i>	08.03.11	-	-	0 (4 F1)
<i>t3206</i>	8	WRM063 8dE10 16µg	<i>sem-4</i>	08.03.11	-	-	0 (8 F1)
<i>t3206</i>	8	WRM067 bE06 12µg	<i>sem-4</i>	19.04.11	4µg	1 (71 F1) bricht nach F3 zusammen	0 (4 F1)
<i>t3206</i>	8	WRM061 9bH02 12µg	Chr. II	19.04.11	4µg	6 (153 F1) brechen nach F4 zusammen	0 (5 F1)
<i>t3206</i>	8	F08A8 12µg	F08A8.5	29.05.11	4µg	0 (0 F1)	0 (0 F1)
<i>t3206</i>	8	WRM063 7aC10 12µg	<i>sdz-30</i>	29.05.11	4µg	0 (0 F1)	0 (3 F1)
<i>t3206</i>	8	WRM062 6dG10	<i>pmr-1</i>	20.06.11	4µg	1 (37 F1) nicht ts	0 (3 F1)

Ergebnisse

		12µg					
<i>t3206</i>	8	W07B12 12µg	W02D9.2	05.07.11	4µg	0 (5 F1)	0 (4 F1)
<i>t3206</i>	8	WRM067 bE06 12µg	<i>sem-4</i>	18.07.11	4 µg	0 (8 F1)	0 (4 F1)
<i>t3206</i>	8	WRM063 7aC10 12µg	<i>sdz-30</i>	18.07.11	4µg	0 (4 F1)	0 (3 F1)
<i>t3206</i>	4	-	-	04.08.11	8µg	0 (89 F1)	-
N2	4	-	-	04.08.11	8µg	2 (100 F1)	-
<i>t3206</i>	8	F08A8 12µg	F08A8.5	14.08.11	4µg	0 (1 F1)	0 (0 F1)
<i>t3206</i>	8	WRM063 <i>8dE10</i> 6µg YAC (Chr. III) 6µg	<i>sem-4</i>	10.10.11	4µg	0 (7 F1)	0 (9 F1)
Summierung							
<i>t3206</i>	124					1 + 7 zusammen gebrochen (445 F1)	2 zusammen gebrochen (52 F1)
<i>t3206</i>	48		<i>sem-4</i>			1 zusammen gebrochen (86 F1)	2 zusammen gebrochen (33 F1)
N2	4					2 (100 F1)	-

Um ein methodisches Problem auszuschließen, hat Cathrin Struck auch noch zweimal versucht *t3206* zu transformieren/komplementieren. Bei diesen 16 Schuss konnten nur ca. 100 F₁ Würmer vereinzelt werden. Davon ergab sich eine Linie, die in der F₃ zusammenbrach und eine Linie, die besser wuchs, jedoch ein ts Test kaum möglich war, da es schwer war L₄-Larven zu finden und zu testen. Insgesamt betrachtet, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Stamm *t3206* sich sehr schlecht transformieren lässt und die Rettung statistisch unwahrscheinlicher auftreten kann.

Als weitere Kontrolle für das WGS-Ergebnis und kleiner Zweifel aufgrund der erschreckenden Anzahl an Mutationen, wurde ein Fragment von *sem-4*, dass über die Mutation reichte, aus der isolierten F₂-DNA von *t3206* und N2-DNA aus unserem Labor amplifiziert und sequenziert. Dies sollte ausschließen, dass die Mutation einem Sequenzierungsfehler zugrunde lag. Beide Sequenzierungen ergaben eindeutig, dass die

Ergebnisse

Daten aus New York korrekt sind und *sem-4* in *t3206* mutiert ist.

Da per Transformation mit unterschiedlichen Fosmiden (Genen), die Mutation nicht reproduzierbar komplementiert werden konnte, war der nächste Versuch die Mutante mit einem Komplementationstest eines Allels von *sem-4* (bei 7,0 Mbp) zu identifizieren. Die ersten Ergebnisse gaben einen Hinweis darauf, dass es sich eventuell um dieses Gen handeln könnte. Eine Analyse der Literatur und der Wormbase ergaben, dass das erfolgversprechendste Allel *tm547* für den Komplementationstest ein Deletionsallel aus dem Labor von Shohei Mitani, Tokyo Women's Medical University School of Medicine, Tokio war. Dies war das einzige Allel, dass auch einen schwerwiegenden (steril, letal) Phänotyp zeigte. Alle anderen bisher isolierten und untersuchten Allel von *sem-4* sind lebensfähig und zeigen nur einen schwachen neuronalen oder Vulva-Defekt, bzw. ein vermeintliches Null-Allel (Basson, M. und Horvitz, H., 1996)) auch beide Defekte.

Da der Stamm aus Japan nur heterozygot war, musste er zunächst balanciert werden, damit das Allel erhalten blieb. Dazu wählte ich den Stamm HS732, der den Balancer hT2 (Translokation Chr. I (linkes Ende bis *unc-101* (12,5 Mbp)) und Chr. III (*dpy-17* (5,1 Mbp) bis rechtes Ende) enthält, der zudem noch GFP markiert ist. Dies macht es einfach, die balancierten Würmer zu erkennen, da sie unter dem Fluoreszenz-Binokular einen grün-fluoreszierenden Pharynx zeigen. Da in diesem Balancer-Stamm ein letales *wrm-1(t514)*-Allel balanciert wird, gibt es keine nicht leuchtende Würmer.

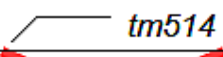
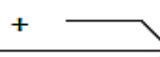



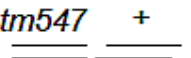
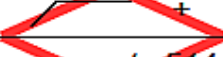


	+ <i>tm514</i>		+ 	
<i>tm547</i> +	+ <i>tm514</i> <i>tm547</i> +			
+ +	+ <i>tm514</i> + +			

Abbildung 53: Punnett-Quadrat zur Balancierung von *tm547* mit HS732.

Aus den heterozygoten Würmern, die das Deletionsallel tragen, ergeben sich zwei mögliche Gameten-Kombinationen (links). Für den Balancer-Stamm hingegen gibt es vier Gameten-Kombinationen (rechts). Weitere Kombinationen sind nicht möglich, da es zu keiner Rekombination kommen kann. Die möglichen Neu-Kombination in den Nachkommen führen zu 50% Letalität (nur ein Balancer-Chromosom enthalten, rotes Kreuz). Von den lebensfähigen Nachkommen exprimieren 50% GFP (ist als Marker auf dem Balancer-Chromosom enthalten, grüner Kasten). Alle Nachkommen, die den Balancer verloren haben, exprimieren kein GFP mehr. Von den balancierten Nachkommen tragen 50% das Deletionsallel.

Die korrekt balancierten Würmer (Abbildung 53, oberer grüner Kasten) habe ich dann per PCR bestätigt, um sie für die Kreuzung mit *t3206* nutzen zu können. Zuvor habe ich noch überprüft, dass dieser neue Stamm korrekt segregiert (Tabelle 9). Dabei zeigte sich, dass das homozygote Deletionsallel larval letal ist. Die Deletion ist 574 bp groß und beginnt im fünften Intron von *sem-4*. Die Deletion geht über in das sechste Exon, wo sie so endet, dass eine weitere Aminosäure eingefügt wird und die letzten 356 AS wie im Wildtyp erhalten sind. Insgesamt würde so das Protein um 138 AS kürzer (als das native Protein)

Ergebnisse

sein. Da die Deletion jedoch über eine Spleiß-Seite reicht, kann das Produkt auch anderes aussehen, indem z.B. das komplette sechste Exon rausgeschnitten wird. Es ist so oder so möglich, dass eine Restaktivität des Proteins erhalten bleibt.

*Tabelle 9: Segregationstest von *tm547/hT2*.*

Insgesamt wurden zehn Würmer in zwei Ansätzen (vier und sechs Würmer) ausgewertet. Dabei wurden die Würmer auf 15°C alle 24h umgesetzt und die Nachkommen ausgezählt, bis keine Eier mehr abgelegt wurden. Da ein Verhältnis von 11:4:1 (dE : GFP-Larven : Larven ohne GFP) erwartet wurde, wurden die Ergebnisse auf Signifikanz mit dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Hierbei ergab sich, dass einige Gelege stark insignifikant waren. Dies kann unter anderem daran liegen, dass nicht alle toten Eier abgelegt werden, oder einige übersehen werden. Aus diesem Grund wurde der Chi-Quadrat-Test nur für das Larven-Verhältnis 4:1 (GFP : ohne GFP) berechnet und alle Ergebnisse waren in einem Vertrauensintervall von $\alpha=0,05$ signifikant. FG: Freiheitsgrad

Wurm	Tote Eier (dE)	Larven mit GFP	Larven ohne GFP	Summe	Chi-Quadrat-Test 11:4:1 2 FG $\alpha(0,05)=5,981$	Chi-Quadrat-Test 4:1 1 FG $\alpha(0,05)=3,841$
1	133	56	11	200	1,07	0,54
2	104	52	6	162	5,43	3,38
3	115	43	8	166	0,61	0,59
4	91	62	13	166	15,45	0,33
Summe	443	213	38	694		3,71
5	115	39	10	164	0,15	0,01
6	112	63	13	188	6,5	0,4
7	147	40	7	194	5,05	0,77
8	28	23	7	58	11,66	0,21
9	151	92	11	254	17,48	5,6
10	119	67	14	200	8,45	0,37
Summe	672	324	62	1058		3,74

Da die Linien korrekt segregierten, wurde *t3206* in den Stamm reingekreuzt. Leider war es auch hier nicht möglich, einen homozygoten Männchen-Stamm zu kreuzen, weshalb ich die Kreuzung mit heterozygoten F₁-Männchen (nach Kreuzung in N2) durchführen musste. Dies führte zu folgendem Kreuzungsschema:

Ergebnisse


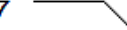
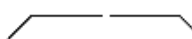
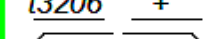
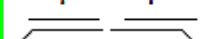
		<i>t3206</i> +	+ +
<i>tm547</i> +		<i>t3206</i> + <i>tm547</i> +	+ + <i>tm547</i> +
 +		<i>t3206</i> + <i>tm547</i> +	+ + <i>tm547</i> +
<i>tm547</i> 		<i>t3206</i> + <i>tm547</i> +	+ + <i>tm547</i> +
		<i>t3206</i> + 	+ + 

Abbildung 54: Punnett-Quadrat zur Komplementation von *tm547* mit *t3206*.

Das Quadrat zeigt, dass max. 50% der Nachkommen lebensfähig sind (Rotes Kreuz = letale Chromosomen-Kombination). Da der Balancer GFP-markiert ist, können die Wildtyp-Chromosomen (grüner Kasten) aussortiert werden. Die nicht leuchtenden Larven müssen auf ts getestet werden, wobei 50% nicht zusätzlich das *t3206*-Allel enthalten und somit nicht ts sein können. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Kombination *tm547/t3206* (blauer Kasten) auch bei 15°C embryonal letal sein könnte. Aus diesem Grund muss das komplette Gelege ausgewertet werden.

Da der Balancer GFP-markiert ist, wurden alle nicht leuchtenden Würmer der F₁-Generation vereinzelt und bei 25°C inkubiert. Die Auszählung der kompletten Nachkommen der auf der restriktiven Temperatur hochgewachsenen F₁-Generation dieser Kreuzung ergab, dass nicht wie erwartet 50% Wildtypen (*tm547/+*) auftraten und 50% Würmer, die nur tote Eier ablegen (*tm547/t3206*). Stattdessen wurden aus drei komplett ausgezählten F₁-Gelegen 65% Würmer gefunden, die zu 100% lebensfähige Nachkommen legten (*tm547/tm547* ist larval letal, also schlüpft noch!) und 35% mit einem breiten Spektrum der Letalitätsrate (4%-83% dE) (Tabelle 10).

Ergebnisse

Tabelle 10: Komplementationsergebnisse der Kreuzung *tm547/hT2* x *t3206/+*.

Es wurden insgesamt Gelege drei unabhängig gekreuzter Linien ausgewertet. Dabei wurde die F₁-Generation in ihrem Segregationsverhalten untersucht und alle Larven, die kein GFP exprimierten, vereinzelt und auf ts getestet. Die F₂-Generation wurde anschließend auf 25°C alle 12h umgesetzt und auch hier das Gelege ausgezählt, um eine Wildtyp-Segregation von einem abweichenden Segregationsmuster unterscheiden zu können. Die Segregation der F₂-Generation weicht vom Wildtyp-Verhältnis ab, allerdings auch von dem erwarteten Verhältnis, falls *t3206 tm547* nicht komplementiert.

Linie 4 422: F ₁ -Segregation (83 dE)				Segregation der F ₂ nach Temperaturwechsel auf 25°C			
	GFP	Kein GFP	Summe	dE und Larven	6	21,00%	11%-68% dE
L ₄	39	28	67	Tote Larven	1	4,00%	Mittelwert: 32% dE
Männchen	23	27	50	Wildtyp	21	75,00%	
Summe	62	55	117				
Linie 4 424: F ₁ -Segregation (57 dE)				Segregation der F ₂ nach Temperaturwechsel auf 25°C			
	GFP	Kein GFP	Summe	dE und Larven	11	32,00%	10%-83% dE
L ₄	16	34	50	Tote Larven	4	12,00%	Mittelwert: 46% dE
Männchen	10	29	39	Wildtyp	19	56,00%	
Summe	26	63	89				
Linie 2 422: F ₁ -Segregation (67 dE)				Segregation der F ₂ nach Temperaturwechsel auf 25°C			
	GFP	Kein GFP	Summe	dE und Larven	11	24,00%	4%-50% dE
L ₄	44	46	90	Tote Larven	5	11,00%	Mittelwert: 16% dE
Männchen	35	39	74	Wildtyp	30	65,00%	
Summe	79	85	164				

Da die Ergebnisse dieser Kreuzung von den theoretisch erwarteten doch abwichen, wurde beschlossen als Kontrolle die Kreuzung mit einem anderen Gen zu wiederholen. Dazu wurde *dpy-5* gewählt. Das Gen liegt auch über dem Balancer und ist zudem ein sichtbarer Marker. Dies hatte den Vorteil in der F₂-Generation das Segregationsverhalten von *dpy-5* überprüfen zu können und so ein eventuelles Abweichen zu erkennen. Der

Ergebnisse

Versuch wurde genauso durchgeführt wie für *t3206*, und ergab wie erwartet 100% Wildtyp-Nachkommen (Tabelle 11). Auch hier haben einige Würmer tote Eier abgelegt, allerdings lag der prozentuale Anteil bei 0,7-2,7%. Dies zeigt, dass das Segregationsmuster der ersten Kreuzung (*tm547* mit *t3206*) eindeutig von der Wildtyp-Segregation abweicht und die Mutation in *t3206* definitiv mit dem dem Allel *sem-4(tm547)* interagiert, bzw. ein neues Allel von *sem-4* ist.

Tabelle 11: Komplementationsergebnisse der Kreuzung *tm547/hT2* x *dpy-5/+*.

Als Kontrolle für die Komplementationsergebnisse von *tm547* mit *t3206* wurde hier mit einem Gen komplementiert, dass definitiv nicht *sem-4* ist, aber über dem Balancer *hT2* liegt. Wie oben beschrieben, wurde der Versuch genauso durchgeführt wie die vorherige Durchführung. Dazu wurden die Segregationsmuster der F_1 - und F_2 -Generation komplett ausgewertet. Wie erwartet komplementiert *dpy-5 tm547*.

Linie I 2: F ₁ -Segregation				Segregation der F ₂ nach Temperaturwechsel auf 25°C(wt : dpy = 7 : 10)			
	GFP	Kein GFP	Summe	dE und Larven	3	17,60%	0,7%-0,9% dE
L ₄	28	17	45	Tote Larven	0	0,00%	Mittelwert : 0,77% dE
Männchen	15	17	32	Wildtyp	14	82,40%	
Summe	43	34	77				
Linie II 2: F ₁ -Segregation				Segregation der F ₂ nach Temperaturwechsel auf 25°C (wt : dpy = 13 : 17)			
	GFP	Kein GFP	Summe	dE und Larven	5	16,70%	1,3%-2,7% dE
L ₄	26	29	55	Tote Larven	0	0,00%	Mittelwert : 1,84% dE
Männchen	20	33	53	Wildtyp	25	83,30%	
Summe	46	62	108				

Ergebnisse

Linie II 2: F ₁ -Segregation				Segregation der F ₂ nach Temperaturwechsel auf 25°C (wt : dpy = 12 : 12)			
	GFP	Kein GFP	Summe	dE und Larven	2	8,30%	0,8%-0,9% dE
L ₄	46	25	71	Tote Larven	0	0,00%	Mittelwert : 0,85% dE
Männchen	25	29	54	Wildtyp	22	91,70%	
Summe	71	54	125				
Linie II 2: F ₁ -Segregation				Segregation der F ₂ nach Temperaturwechsel (wt : dpy = 6 : 6)			
	GFP	Kein GFP	Summe	dE und Larven	3	25,00%	0,8%-2,2% dE
L ₄	56	12	68	Tote Larven	0	0,00%	Mittelwert : 1,43% dE
Männchen	3	12	15	Wildtyp	9	75,00%	
Summe	59	24	83				

Funktion von *sem-4* in *C. elegans*

sem-4 wurde erstmals 1996 von Michael Basson und H. Robert Horvitz in *C. elegans* beschrieben. Diverse Allele dieses Gens wurden bei einer Mutantenlese für Mutanten mit defekten *sex muscle* (*sex muscle abnormal*). Diese *sem-4*-Allelen haben einen starken Egl-Phänotyp, der darauf zurückzuführen ist, dass die *sex*-Myoblasten in Muskelzellen transformiert werden. Die Würmer sind daher nicht in der Lage Embryonen abzulegen. Des weiteren beschrieben die beiden noch Transformationen in Neuronen und Coelomyceten. Die Klonierung der Mutation ergab, dass es sich um einen konservierten Transkriptionsfaktor handelt. SEM-4 hat sieben Zinkfinger-Motive und ist konserviert in *Drosophila melanogaster* (*spalt*) bis zum Menschen (SALL1) (Abbildung 55). Die Sequenzierung und genetische Vergleiche der Allele führten dazu, dass Michael Basson und H. Robert Horvitz drei Allele als mögliche Null-Allele beschrieben, da diese in allen beschriebenen Geweben Defekte aufwiesen und ihre Mutationen vermutlich alle, oder sechs der sieben, Zinkfinger betreffen. *n2477* ändert die 82. Aminosäure in ein Stopp-Codon (Q82ochre). Dieser Austausch liegt noch vor dem ersten Zinkfinger-Motiv (Abbildung 56).

Ergebnisse

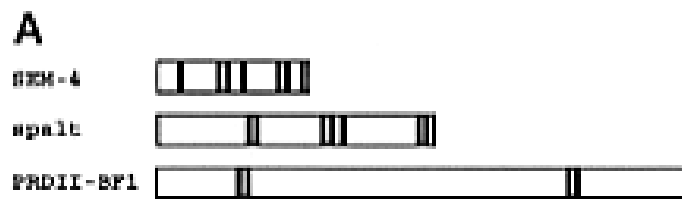


Abbildung 55: Vergleich der *spalt*-Homologe von *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* und dem Menschen.

SEM-4 (*C. elegans*), *spalt* (*Drosophila melanogaster*) und PRDII-BF1 (heute SALL1, *Homo sapiens*) als Schema. Die Balken geben die relative Länge der Proteine an und die Zinkfinger-Motive sind als schwarze Striche eingefügt. Man erkennt, dass SEM-4 zwar das kürzeste Protein bildet, jedoch die meisten (sieben) Zinkfinger-Motive besitzt. *Abbildung aus Basson, M. und Horvitz, H., 1996.*

n2087 betrifft einen *splice donor*. Der erste Zinkfinger bleibt erhalten. Das dritte Allel führt zu einem Stopp-Codon bei AS 321 (Q321ochre). Diese Aminosäure liegt im zweiten Zinkfinger. Weitere Allele betreffen nur den zweiten Zinkfinger (*n2654*) oder verkürzen das Protein um zwei Zinkfinger (*n1378*). Da die *loss-of-function* Allele (*n2654* und *n1378*) nur jeweils einen Teil der Defekte der Null-Allele zeigten, wurde geschlossen, dass der zweite Zinkfinger für die neuronale Funktion wichtig ist und die letzten beiden Zinkfinger für die Myoblasten-Differenzierung.

```

MNELLAEMAA VSSRRKQSKP RRMSGEGDAM MSPIDLSTKS FDENNCEKGA 50
GGALPLEDRS NILPHFSVFF ANPQQFLSLC AQLGNSSSRN VSSTASTTSS 100
CPIQSCSQSF SSPAALTWHV LDAHEDEQEI FSCDVCTTTF SNGQDIREHK 150
CQKTLASRST SVPPSTIPSS VCFLSTPTTP CLQFSINESI GTSEIREEDE 200
EEDMDVEDGE HVANQLFGHL LQKSDDKSKM ASLFNHAFPP FAAFPMMPPP 250
FLMRQPFDPK ADVFAAGRHD NDDWEALME ISTSDEAEKI RALVGDKAVP 300
TTDPNQCILC RRVLSCSAL QMHYRTHTGE RPFKCKICQR AFTTKGNLKT 350
HMGVHRSKHS FRGLPISLPP QLAAMHQHQH QIAPPQRIHI HNPPTSAAASA 400
AAAVAQIQAS QOCPICQORF LNAGELAVHI TEHRNSLTQP PRVMPTPTTT 450
RVQTFPFVPF FTTPPSLNAT DMSTQFNLAN ILSAQLKNDS SPNTDTSSVE 500
EKITRDDPPK MASLSPSNSS DSSSSVRQDI LESSEFEEKL KKLEPPPILE 550
QQVSTTPNPK NENPLLAMQK MWAETEPPPP RQMPVLSKHQ CGVCFKHFESS 600
SSALQIHMRT HTGDKPFKCD MCGRAFTTRG NLKVHMGTHS WQQSPSRGR 650
RIFDVASSVT EKPMLQSPIL PTSGAPGASP LAMLGPNGLS GLEMMMLWR 700
TVCSVCQKVC QSPNELEQHL KEHLNNGSSA APTPLASAAT PPPS 744

```

Abbildung 56: Aminosäure-Sequenz von SEM-4.

SEM-4 setzt sich aus 744 AS zusammen. Unterstrichen werden die sieben Zinkfinger-Motive angegeben. Des weiteren ist in rot die Punktmutation von *t3206* (P69L) und grün die Punktmutation von *n2477* (Q82ochre) angegeben. Die blau hinterlegten Basen sind in dem Allel *tm547* deletiert, sowie die türkis-eingefärbte Base, welche in diesem Allel von Isoleucin zu Lysin (I388) verändert wird. *Verändert nach Basson, M. und Horvitz, H., 1996.*

Ergebnisse

Weitere Untersuchungen zu SEM-4 beschäftigten sich auch ausschließlich mit der Funktion in der larvalen Entwicklung. Toker, A. et al. untersuchten die Funktion von SEM-4 in Neuronen von *C. elegans*. Hierbei fanden sie heraus, dass *sem-4* als konserviertes Gen auch in *C. elegans* als Transkriptionsrepressor von homeotischen Genen fungiert. Die Autoren konnten zeigen, dass SEM-4 an DNA bindet. Des Weiteren, dass die HOX-Gene *egl-5* (900bp und 3,5 kb *upstream* des Translationsstarts), *mab-5* (5 kb *upstream*) und *lin-39* (10 kb *upstream*) in ihren Promotor-Regionen Bindestellen für SEM-4 haben. Für *egl-5* konnte zudem gezeigt werden, dass eine Überexpression des *egl-5::GFP*-Proteins in einer *sem-4*-Mutante zu ektoptischer GFP-Expression in einigen Zellen der larvalen T-Zelllinie führt. Dies deutet darauf hin, dass *sem-4* *egl-5* reprimiert.

Grant et al. untersuchten die Funktion von *sem-4* in den VPCs (Vulva-Vorläuferzellen). In *sem-4*-Mutanten sind Transformationen in der Vulva-Zelllinie zu beobachten, welche auf die Regulation von *lin-39* zurückzuführen sind. *lin-39* kodiert für ein homeotisches Gen, das in der Vulva-Entwicklung Zellfusionen verhindert. Dies ist wichtig, da sonst in der L₁-Larve alle VPCs miteinander fusionieren und Hypodermis, anstelle einer Vulva bilden. Doppelmutanten von *sem-4* und *lin-39* zeigten einen starken Synergie-Effekt, indem die Induktion des Vulva-Schicksals in der P5.p und P7.p (beides VPCs) stark abnimmt, verglichen mit den Einzelmutanten. Auch wurde für späte Larvenstadien (L₃) gezeigt, dass einen *lin-39::lacZ*-Fusion in *sem-4* reprimiert wird. Allerdings konnte diese Färbung nicht komplett reduziert werden. Dies deutet darauf hin, dass *sem-4* in den VPCs P5.p und P7.p *lin-39* positiv reguliert. Eine weitere Arbeit (Wagmeister, J. et al., 2006) konnte mit einem LIN-39::GFP-Fusionsprotein keine Regulation von *lin-39* in P6.p (VPC) durch *sem-4* nachweisen.

Erstaunlicherweise sind aus allen anderen Organismen (*Drosophila melanogaster* bis zum Menschen) embryonal letale Mutationen für Homologe der *spalt*-Familie bekannt. Am besten untersucht ist die Funktion von *spalt* aus *Drosophila melanogaster*. Dort sind sowohl Funktionen in der Festlegung der Kopf- und Schwanz-Region in der frühen Embryogenese (Jürgens, 1988), als auch eine Funktion in der Imaginalscheibe des Auges bekannt (Mollereau et al., 2001). Eine Untersuchung des Expressionsmusters von *spalt* im Embryo zeigte, dass die Regulation sehr komplex ist und von vielen *gap*-Gene (z.B. *krüppel* und *hunchback*) abhängig ist (Kühnlein et al., 1997).

Bezieht man in diese Ergebnisse ein, dass Toker, et al. zudem einen Temperatur-Effekt in *sem-4* entdeckten, könnten es darauf hinweisen, dass die vermeintlichen Null-Allele doch eine Restfunktion haben. Auch das Deletionsallel *tm547* und die von Basson und Horvitz benutzte Defizienz *nDf43* zeigen einen larval letalen Phänotyp. *t3206* hat eine *missense*-Mutation an Stelle 69 von Prolin zu Lysin. Dies liegt noch 13 AS vor der bisher „ersten“ bekannten Mutation (*n2477*). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass auch die starken Allele von Basson und Horvitz tote Embryonen legen, die jedoch niemanden aufgefallen sind.

Hat *t3206* Einfluss auf potentielle SEM-4 Interaktionen ?

Da es in *C. elegans* momentan keine Methode gibt, Gene auf der DNA-Ebene gezielt komplett auszuschalten, ist eine Alternative die Genaktivität zu reduzieren die Methode des RNAi (Fraser, A. et al., 2000). Dabei wird dsRNA des interessanten Gens in den Wurm

Ergebnisse

eingbracht, welche in die Zellen des Wurms aufgenommen wird und dort durch ein Enzym (Dicer) in kleine (21nt) Stücke geschnitten wird. Diese werden dann in den RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) aufgenommen, der über diese spezifischen komplementären Stücke die mRNA des betroffenen Gens abbaut. Diese Methode verringert jedoch nur das mRNA Level genspezifisch (max. 80%) und es bleibt meist eine Restaktivität des Gens bestehen. Dies hat zur Folge, dass einige Gene, deren Phänotyp durch Mutanten bekannt ist, im RNAi keinen Phänotyp zeigen.

Für diesen Versuch wurde ein Fragment aus *sem-4* per Injektion direkt in die Gonaden von jungen adulten Würmern eingebracht. Zudem wurde das Fragment noch in den *feeding*-Vektor L4440 subkloniert und in den *E. coli*-Stamm HT115 transformiert, um dann in Form von Bakterien an die Würmer verfüttert zu werden. Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile. So ist häufig die Methode der Injektion die effektivste, da große Mengen an dsRNA direkt in die Oozyten verpackt werden. Allerdings hat das *feeding* z.B. den Vorteil, dass auch Effekte in z.B. Larven untersucht werden können. Zudem kann eine größere Anzahl an Würmern behandelt werden und es ist weniger invasiv, was die Anzahl der überlebenden Würmer erhöht.

Der RNAi von *sem-4* im Wildtyp ergab mit beiden Methoden (Tabelle 12) leider keinen Phänotyp. Auch der RNAi auf der permissiven (15°C) und restriktiven (25°C) Temperatur hatte keinen Einfluss auf den Phänotyp der Mutante.

Tabelle 12: Anzahl der mittels *sem-4*-RNAi behandelten Würmer durch Injektion und *feeding* im Wildtyp und *t3206*.

Für beide Methoden wurden jeweils mindestens 20 Würmer bei 15°C und 25°C untersucht.

Injektion von dsRNA		
	15°C	25°C
N2	35 Würmer	20 Würmer
t3206	25 Würmer	20 Würmer
dsRNA feeding		
	15°C	25°C
N2	20 Würmer	20 Würmer
t3206	20 Würmer	20 Würmer

Dies bedeutet entweder, dass das verwendete Gen-Fragment eventuell nicht das geeignetste ist (bzw. das Konstrukt nicht einwandfrei ist), oder RNAi im Fall von *sem-4* nicht funktioniert. Somit kann durch diesen RNAi keine Aussage über die Funktion von *sem-4* im *C. elegans* Embryo gemacht werden. Dieses Ergebnis zeigt den großen Nachteil der Methode auf. Nur im Falle eines auftretenden Phänotyps ist ein RNAi aussagekräftig, da nur ca. 80% der RNA abgebaut wird. Daher funktioniert diese Methode meistens nur bei stark exprimierten Genen sehr gut. Häufig ergibt ein RNAi keinen Phänotyp, wobei Allele für diese Gene bekannt sind, die eine Ausprägung zeigen.

Ergebnisse

Eine weiterer Ansatz zu beweisen, dass *t3206* ein neues Allel von *sem-4* ist, war über die beschriebenen Interaktionen von SEM-4 Rückschlüsse auf die Mechanismen in *t3206* zu ziehen. Wie im Absatz zuvor beschrieben, gibt es über die Funktion von SEM-4 im Embryo von *C. elegans* fast keine Daten, bzw. wird nur über gewebespezifische Funktionen und Interaktionen in der Larve berichtet.

Der offensichtlichste Ansatz ist, durch einen GFP-Reporter die SEM-4-Expression *in vivo* zu untersuchen. Eine Untersuchung eines bekannten SEM-4-Reporter-Stamms (MH1346, verwendet von Toker, A. et al., 2003 und Grant, K. et al., 2000) zeigte keine frühe embryonale Expression. Da der Stamm sehr instabil war, wurde von Sophie Ziegler ein *sem-4*-Promotor Konstrukt kloniert, dass ein H2B::GFP-Fusionsprotein reguliert.

Trotz Problemen bei der Transformation dieses Konstruktes (pers. Kommunikation Sophie Ziegler), konnte eine stabile Linie etabliert werden.

Die Analyse des GFP-Konstrukts zeigt eine starke Mosaik-Expression. Dies liegt unter anderem wahrscheinlich daran, dass nur ca. 20% der Embryonen überhaupt eine Expression zeigen. Zusätzlich zu den Nachkommen der AB-Zelllinie exprimieren in einigen Embryonen auch noch späte Zellen der MS- und E-Zelllinie. Eine Auswertung dieses Expressionsmusters in Hinblick auf die Funktion von SEM-4 ist somit sehr schwierig, zudem es sich auch nur um ein Promotor-Konstrukt handelt. Allerdings ist dies das erste Mal, dass die Möglichkeit aufgezeigt wurde, dass *sem-4* im Embryo exprimiert wird. Auch das Zeitfenster der Expression (ab 128-AB-Zellen) stimmt mit dem Phänotyp von *t3206* überein. Insgesamt ist jedoch mysteriös, warum sich selbst ein *sem-4*-Promotor-Konstrukt (wie alle anderen *sem-4*-Konstrukte) so schlecht transformieren lässt.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass SEM-4 die Genexpression von u.a. *lin-39* und *egl-5* (siehe Funktion von *sem-4* in *C. elegans*) in einzelnen Zellen steuern soll, wurden GFP-Reporterstämme von diesen Genen bestellt. Zunächst wurde die Expression von *egl-5::GFP* im Embryo analysiert, da die meisten Arbeiten zu diesem Thema in der Larve untersucht wurden. Es war somit unklar, ob und/oder wann das Gen im Embryo exprimiert wird, bzw. die komplette Expression im Embryo erfasst wurde.

Das Konstrukt enthält die vermutliche genspezifische Promotor-Sequenz sowie den ORF mit einem *in frame* klonierten GFP. Ein Nachteil des *egl-5*-Konstrukte ist jedoch, dass es trotz großer 5'UTR (7kb) Mutanten nicht komplementieren kann. Die Aufnahmen der Stämme zeigte, jedoch eine Expression im Embryo (Abbildung 57).

Ergebnisse

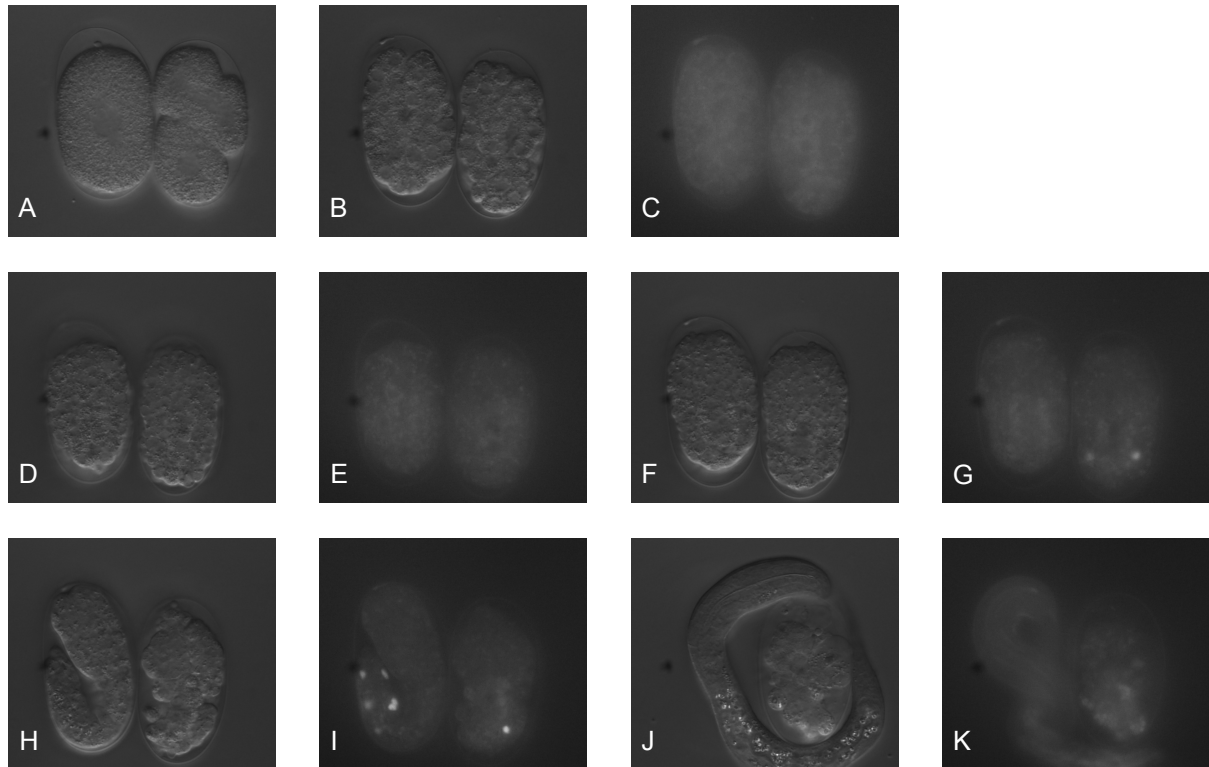


Abbildung 57: Expressionsmuster von *egl-5::GFP*.

Während der frühen Embryogenese wird *egl-5::GFP* nicht exprimiert (A – E). Erst ab dem späten prämorphogenetischen Stadium (F) sieht man eine Expression in posterioren Zellen (G). Diese Expression wird beibehalten (H und I) und weicht auch in Embryonen, die eine *him-5*-Mutation im Hintergrund tragen (rechter Embryo, nicht ab (siehe Text)).

Das *egl-5::GFP*-Konstrukt wird nur in der C-Zelllinie exprimiert. Wie schon aus anderen Publikationen (Brunschwig, K. et al., 1999) bekannt, wird auch dieses Transgen nur im posterioren Teil des Embryos (Abschnitt hinter dem Darm-Cluster) exprimiert. Die Expression beschränkt sich auf Nachkommen aus der Zelllinie Cap und Cpp. In diesen Linien beginnt jeweils in den Zellen Cxxapp, Cxxpap und Cxxppp die Expression. Diese Expression hält auch in jeweils beiden Tochterzellen an und verändert sich nicht mehr, bis der Embryo sich zu bewegen beginnt. Danach ist eine eventuelle Änderung der Expression schwer zu beurteilen, da die Zellen nicht mehr genau zugeordnet werden können. Auffällig ist jedoch bei diesem Muster, dass jeweils nur die posterioren Zellen mit der Expression beginnen und sich dieses Muster links-rechts (a-p) symmetrisch ist.

Da *egl-5* in der Larve und im adulten Wurm nur sehr stark im Fächer (Korpulationsorgan) der Männchen exprimiert wird, trägt dieser Stamm eine *him-5(e1490)*-Mutation. Diese Mutation führt zu einer erhöhten Männchen-Rate, da ein Verlust des Gens zu einer erhöhten Rate von *non-disjunction* führt. Dies bedeutet, dass während der Meiose Chromosomen fehlverteilt werden. Trifft es zufälligerweise ein X-Chromosom, entsteht ein Männchen. Da *non-disjunction* in der Natur auch vorkommt, entstehen so auch „normale“ *C. elegans* Männchen. Allerdings liegt die Rate bei maximal 0,1-1%, es sei denn die Würmer werden Stress (z.B. Nahrungsknappheit) ausgesetzt, was die Rate erhöht. Da durch die *him-5(e1490)*-Mutation natürlich auch alle anderen Chromosomen betroffen sein können, bedeutet dies, dass dieser Stamm teilweise tote Eier produziert (Abbildung

Ergebnisse

57). Eine Analyse dieser Embryonen ergab allerdings, dass das Expressionsmuster von *egl-5::GFP* in *him-5*-Embryonen nicht von dem der sich normal entwickelnden Embryonen abweicht.

Der *egl-5::GFP*-Stamm zeigte ein für ein Hox-Gen erwartetes a → p Muster (immer nur p). Da eine Vermutung war, dass *t3206* auch einen a → p Defekt hat, war es naheliegend diesen Stamm einzukreuzen. Ein Vorteil war, dass das Transgen zufällig ins Genom integriert wurde. Das bedeutet, dass es weder Würmer gibt, deren Nachkommen kein Transgen mehr besitzen, noch das Problem der Mosaik-Expression durch Transgen-Verlust oder *silencing*.

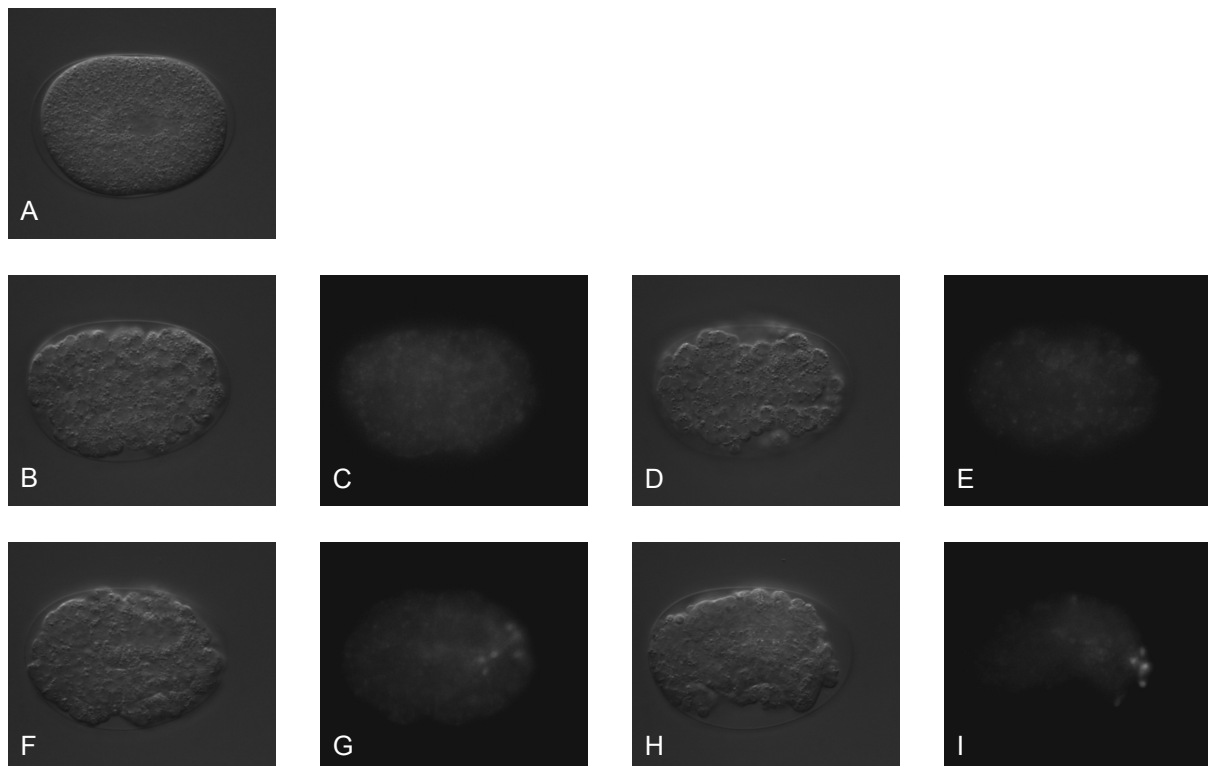


Abbildung 58: *egl-5::GFP*-Expression in einem *t3206*-Hintergrund.

Wie auch schon Abbildung 57 gezeigt, wird auch in *t3206* *egl-5::GFP* in der C-Zelllinie exprimiert. Die Expression beginnt wie im Wildtyp im späten prämorphogenetischen Stadium (D und E). Jedoch exprimieren im späteren Verlauf der Entwicklung (F bis I) noch zusätzliche C-Zellen GFP.

Die Expression von *egl-5::GFP* in einem *t3206*-Hintergrund zeigte, dass das Muster des Wildtyps größtenteils erhalten ist. In der anterioren Zelllinie wird wie im Wildtyp *egl-5::GFP* in Cppppp, Cappap und Capapp exprimiert. In der posterioren Zelllinie exprimiert auch Cppppp wie im Wildtyp das Fusionsprotein. Hingegen ist in Cpppap keine Expression zu sehen. Stattdessen exprimiert Cppaap das GFP-Konstrukt. Diese Zelle exprimiert im Wildtyp dieses Konstrukt nicht (Abbildung 58).

Diese Veränderung des Expressionsmusters von *egl-5::GFP* zeigt, dass *t3206* einen Einfluss hat. Es ist allerdings unklar, ob diese Regulation direkt ist, da zwar *egl-5::GFP* in einer zusätzlichen Zelle exprimiert wird, jedoch eine andere Zelle nicht mehr exprimiert. Zwar konnte in der etablierten Linie von Sophie Ziegler bisher keine *sem-4::GFP*-Expression in der C-Zelllinie nachgewiesen werden, aber dies bedeutet jedoch nicht, dass

Ergebnisse

SEM-4 nicht *egl-5* regulieren kann. In beiden Fällen werden die Konstrukte überexprimiert, unter einem Promotor, von dem nicht bekannt ist, ob er komplett ist. Gerade für HOX-Gene ist bekannt, dass die regulatorischen Bereiche sehr groß und komplex sind. Für *lin-39* z.B. wurde *in vitro* eine Bindestelle für SEM-4 10kb *upstream* des Translationsstarts nachgewiesen (Toker, A. et al., 2003). Zudem zeigt die *sem-4*-Linie nur eine Mosaik-Expression, so dass eventuell nur ein Bruchteil der normalerweise exprimierenden Zellen GFP-Expression zeigen. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass alle exprimierenden Embryonen ein unterschiedliches Expressionsmuster zeigen.

Diskussion

Das Anliegen dieser Arbeit war, eine Mutante zu isolieren, die einen Hinweis auf den Mechanismus der Zellfokussierung geben könnte. Hierzu wurden in einer groß angelegten Mutagenese zwei Kandidaten isoliert. Bei den beiden betroffenen Genen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. Das lässt bestimmt keinen Rückschluss auf den direkten zellbiologischen Mechanismus der Zellfokussierung zu, trotzdem sind beide (in diesem Zusammenhang) in ihrer direkten Funktion interessant. LET-19 ist als Untereinheit des Mediator-Komplexes bekannt und hat sowohl verstärkenden wie auch reprimierenden Einfluss auf die Transkription. Laut Promotor-Analyse wird LET-19 ubiquitär schon ab dem 20-50-Zeller exprimiert und behält diese Expression bei. Ich vermute, dass es auch schon früher in der Embryogenese exprimiert wird, jedoch durch die Expression vom Array keine maternale Expression auftritt. Das ist ein bekanntes Problem in *C. elegans*. Trotzdem hat *let-19(t3205)* ein nahezu normales prämorphogenetisches Stadium, obwohl Schicksalstransformationen stattfinden. Nach den bisherigen Ergebnissen migrieren Zellen, die ein neues Schicksal haben an ihre neue Position, die ihrer neuen Zellidentität entspricht (Schnabel, R. et al. 2006). Wenn diese Hypothese stimmt, bedeutet das für *let-19*, dass entweder die Schicksalstransformationen erst sehr spät stattfinden, oder dass das Signal für ein neues Schicksal transkriptionell nicht mehr umgesetzt werden kann. Das kein klares Muster in den Transformationen (siehe Zelltod-Muster Tabelle 7) zu erkennen ist, denke ich, liegt an der mangelnden Penetranz eines hypomorphen Allels. Einige Gewebe scheinen jedoch stärker auf LET-19 angewiesen zu sein als andere (z.B. halber Pharynx). Dies könnte daran liegen, dass in dem Fall eventuell LET-19 eine positive Regulation bewirkt, oder dass das Allel vermutlich ein hypomorphes Allel ist und wie auch andere Allele (Wang, J. et al., 2004) deshalb einen gewebespezifischen Defekt aufweist. Grundsätzlich stellt sich hieraus die Frage für die Embryogenese von *C. elegans*, wie lange Induktionen stattfinden, die zur Zellidentität beitragen. Wenn die Zellen ihre Identität über einen binären Code (Kaletta, T., Schnabel, H. und Schnabel R., 1997) erhalten, bedeutet dies für die Zellfokussierung eventuell, dass die Zellposition nicht mit der endgültigen Zellidentität gekoppelt ist, sondern eine Einordnung mit der regionalen Identität möglich ist, oder der Grunddifferenzierung zu einem Gewebetyp (z.B. Neuron, aber nicht sensorisches Neuron). Eine weitere Frage ist, ob eine einzelne Zelle mit einem neuen Schicksal in der Lage ist, in einem stabilen Feld eine neue Position zu erreichen. Vorstellbar wäre auch, dass sie sich durch den Kontext aller anderen Zellen nicht falsch positionieren kann. Diese Mutante legt jedoch nahe, dass die Zellidentitäten und -positionen durch die binäre Spezifikation wahrscheinlich nach und nach festgelegt werden. Damit könnten die Zellen in ihrer Entwicklung z.B. zuerst eine regionale Zellidentität und -position erhalten. Diese würde die Zelle unabhängig von ihrer späteren Differenzierung innerhalb ihrer Region halten. Damit wäre bei späteren Transformationen innerhalb der binären Spezifikation innerhalb des Embryos kein komplettes Chaos mehr möglich, da die Zellen regional gebunden wären. Dies würde erklären warum das prämorphogenetische Stadium in *t3205* fast normal erscheint, da die regionalen Gründerzellen wahrscheinlich noch nicht betroffen sind. Es wäre im Zusammenhang mit der Zellfokussierungshypothese interessant zu wissen, ob diese postulierte regionale Zellidentität im Zusammenhang mit den Nachbarschaftsbeziehungen, die die Zellposition

Diskussion

festlegen soll, „überstimmt“ werden kann. Sollte dies der Fall sein, sollten Regionen „auseinander fallen“ können und sich in Teilregionen sortieren müssen. Um diese Unterscheidungen treffen zu können, sind jedoch noch Fortschritte in der Bioinformatik notwendig.

Die zweite Mutante *t3206*, ist nach unserer anfänglichen Definition eine Zellfokussierungsmutante. Zellen sind ohne ersichtliche Schicksalstransformation falsch positioniert. Allerdings ist aus der Literatur über *sem-4* bekannt, dass in der Larve Transformationen stattfinden, wenn auch von z.B. einen Neuronen-Typ in einen anderen (Toker, A. et al., 2003). Interessanterweise handelt es sich bei *sem-4* um einen Transkriptionsfaktor, der selbst als Homeobox-Gen bekannt ist und HOXC-Gene regulieren soll. HOX-Gene sind besonders aus *Drosophila* bekannt und spielen bei der Entwicklung von der Fliege bis zum Menschen eine Rolle in der Etablierung und Identität von Segmenten (z.B. Wirbelsäuleneinteilung in Lendenwirbel, Brustwirbel,...). In *C. elegans* treten zum ersten Mal (evolutionsbiologisch betrachtet) die HOX-Gene in einem ursprünglichen Gen-Cluster auf. Diese Cluster ist bis auf einige Abweichungen mit denen von *Drosophila* und dem Menschen vergleichbar (Abbildung 60).

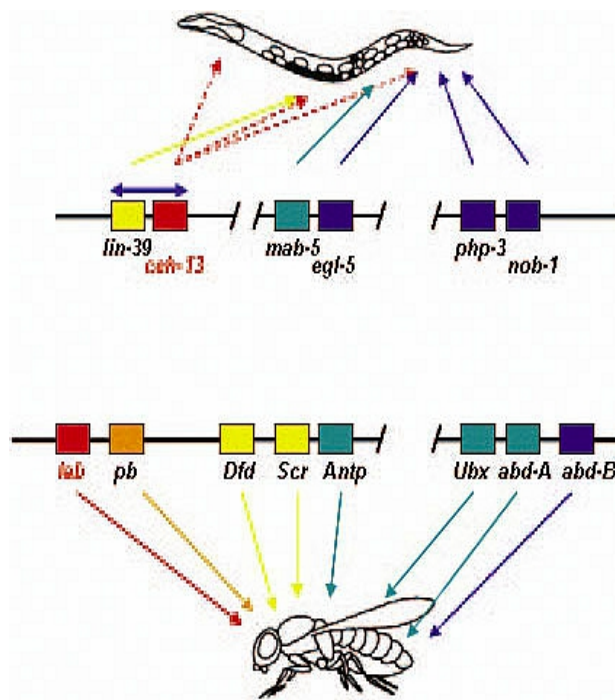


Abbildung 60: Das HOX-Gencluster in *C. elegans* und *Drosophila melanogaster*.

Auch *Drosophila* hat ein vergleichbares HOX-Cluster wie *C. elegans*. Wie für die HOX-Gene bekannt ist in *Drosophila* die Kolinearität der Gene auf dem Chromosom gegeben. In *C. elegans* hingegen widerspricht die Anordnung der anterioren Gene dieser Regel. Des weiteren sieht man, dass es zwischen den einzelnen Organismen zu unterschiedlichen Duplikationen, aber auch Verlusten von Genen kommen kann. Abbildung aus Tihanyi, B. et al., 2010.

Im Gegensatz zu der Fliege und dem Menschen ist *C. elegans* jedoch nicht segmentiert. Die Frage (welche noch nicht beantwortet werden konnte) ist also, welches die ursprüngliche Funktion der HOX-Gene ist. Es gibt einige Hinweise darauf, dass HOX-

Diskussion

Gene in *C. elegans* eine Funktion in der Definition der späten a-p-Achse haben (Harris, J. et al., 1996). Betrachtet man die Funktion von *sem-4* (*spalt*) in *Drosophila*, so definiert *spalt* nicht direkt die Segmente, sondern wird zwischen zwei unterschiedlichen HOX-Genen exprimiert und verstärkt (zieht) damit Grenzen (Mollereau, B., et al., 2001). Sollte *sem-4* eine vergleichbare Funktion (*proof-reading* auf der a-p-Achse) in *C. elegans* haben, könnte dies die hohe Variabilität zwischen den Embryonen erklären. Wie für den WNT-Pathway bekannt ist, wird dort ein Gen *lat-1* (Langenhan, T. et al., 2009) exprimiert für den Fall, dass Signale uneindeutig sind. So kann es sein, dass mutante Embryonen sich wie ein Wildtyp entwickeln, da das Gen nicht gebraucht wird, und andere sterben. Dies geschieht unter nahezu identischen Laborbedingungen.

Diese Ergebnisse lassen damit eventuell auch einen Rückschluss auf die ursprüngliche Funktion der HOX-Gene zu. Da *C. elegans* eine invariante Zelllinie besitzt, wurde angenommen, dass die HOX-Gene Zelllinien-spezifisch oder regional exprimiert werden müssen. Dies trifft jedoch nur bedingt zu. Wenn man diese Ergebnisse betrachtet, wäre eine Möglichkeit, dass die HOX-Gene unter anderem einen entschiedenen Anteil an der Zellfokussierung haben und so die regionalen Schicksale definieren. Gerade mit den beobachteten Fehl-Migrationen auf der a-p-Achse (Harris, J. et al., 1996) könnten die HOX-Gene eventuell die Zellidentität mit der Zellposition verbinden. Auch in anderen Organismen wurde darüber spekuliert, dass HOX-Gene keine zellspezifischen Signalwege induzieren, die ein spezielles Schicksal bedeuten, sondern über ihre „unspezifische“ überlappenden Bindungsdomänen eher die zeitliche Expression und das Zusammenspiel/Konkurrenz mehrerer HOX-Gene im Zusammenhang erst Zell- bzw. Segmentidentitäten festlegen (Deutsch, J.S., 2010). Dies würde unseren Beobachtungen in *C. elegans* sehr nahe kommen. So konnte Jana Zenk für das HOXC-Gen *mab-5* zeigen, dass bei verkürzten Promotor-Konstrukten *mab-5* nicht nur posterior exprimiert wird, sondern schon fast ubiquitär (pers. Kommunikation Jana Zenk). Dies lässt darauf schließen, dass viele reprimierende Elemente in dem 5' *upstream* Bereich des Promotors von *mab-5* liegen müssen. Eines dieser Elemente ist unter anderem wahrscheinlich eine Bindestelle von *sem-4* (Toker, A. et al., 2003). Interessanterweise konnten wir für diverse HOX-Gen-Reporter (*mab-5*, *lin-39*, *egl-5*, *ceh-13*) bisher immer nur eine posteriore embryonale Expression sehen. Die einzelnen Mutanten zeigen jedoch auch anteriore Defekte (z.B. *ceh-13*(*sw1*) und *mab-5*(*e1239*), pers. Kommunikation Daniel Findeis). Diese Beobachtungen legen auch eine anteriore Funktion der HOX-Gene nah, jedoch konnte bisher noch nicht molekular biologisch gezeigt werden, dass sie anterior im Embryo auch exprimiert werden.

Sollten die Hox-Gene in der Regulation der Zellfokussierung auf der a-p-Achse beteiligt sein, wäre dies die erste Hypothese, die damit in der Lage wäre, alle bisherigen berichteten Funktionen zu erklären. Da über Zellfokussierung sowohl die embryonale Funktion in *C. elegans* erklärt werden kann, aber auch die Etablierung der Segmente auf der Körperachse (z.B. *Drosophila*) über regionale Identitäten, sowie die Bedeutung im ZNS und bei neuronaler Migration (Deutsch, J.S., 2010).

Rückblickend kann mit diesen Ergebnissen die Mutagenese als Erfolg angesehen werden, wobei noch abzuwarten ist, welche anderen Entdeckungen in den isolierten Stämmen stecken (siehe Abschnitt Worm Community). Allerdings ist der Ansatz noch optimierbar. Besonders die Identifizierung von Zellfokussierungskandidaten (auch in Hinblick auf die

Diskussion

Bioinformatik) stellte sich als sehr mühsam dar. Da sich im Laufe der Arbeit immer mehr die Einsicht ergab, dass potentielle Zellfokussierungskandidaten nur nach einer kompletten Zelllinienanalyse bis ins prämorphogenetische Stadium erkannt werden können, ist dies bestimmt der Punkt, an dem man ansetzen müsste. Ein möglicher Weg wäre die Embryonen automatisch analysieren zu lassen und auch die ersten bioinformatischen Berechnungen (Distanzkarten, RMS, ...) zu automatisieren. Die Problematik ist bisher jedoch, dass es kein verlässliches Programm gibt, dass eine automatische Zelllinienanalyse durchführen kann. Frei erhältliche Programme sind in der Lage GFP-markierte Zellkerne zu verfolgen und so eine Zelllinienanalyse aufzuzeichnen. Allerdings ist hier der Nachteil, dass erneut ein GFP-Stamm mutagenisiert werden müsste (siehe Dissertation Arend Hintze, 2006) und die Embryonen durch eine permanente Fluoreszenz-Belichtung so stark gestresst werden können, dass sie in der Entwicklung arretieren oder sterben. Dies würde bedeuten, dass jeder Stamm als Kontrolle noch mindestens ein zweites Mal unter DIC-Bedingungen aufgenommen werden müsste. Dies würde eine Verdopplung der Arbeit und Materialien bedeuten.

Eine andere Alternative wäre, in Hinsicht auf *t3091* (Nadin Memar, 2012), bekannte Mutanten des Zuckerstoffwechsels näher zu betrachten. Da aber gerade diese Mutation zeigt, wie pleiotrop der Phänotyp solcher Mutante sein kann, ist es notwendig mit *ts*-Mutationen zu arbeiten, um die Protein-Funktionen voneinander trennen zu können. Die wenigsten bekannten Mutanten betreffen jedoch *ts*-Mutationen. Insofern wäre ein weiterer Mutagenese-Ansatz zur Isolierung von embryonal letaler *ts*-Mutanten nötig. Allerdings wäre es zu überlegen, ob es eine Möglichkeit gäbe Mutanten des Zuckerstoffwechsel zu markieren, damit diese schneller identifiziert werden können. Es wäre z.B. denkbar vor der Zelllinienanalyse der Embryonen zu testen, ob die Würmer einen geringeren Gesamtzuckergehalt haben. Sollte dies der Fall sein, wäre die Wahrscheinlichkeit höher, dass es sich um eine Zellfokussierungsmutante handeln könnte.

Ein wichtiger weiterer Faktor dieser Arbeit war die bioinformatische Analyse der Mutanten. Dabei stellte sich immer wieder heraus, dass durch die Tatsache, dass der *C. elegans*-Embryo oval ist und keinen internen Fixpunkt besitzt, eine Aussage über die Position einer Zelle innerhalb des Embryos schwieriger zu definieren ist als vermutet. Da die Position einer Zelle nur über den Kontext der anderen Zellen bestimmt werden kann, müssen alle Zellen in die Berechnung einbezogen werden. Dies bedeutet im Endeffekt, dass auch fehlplatzierte Zellen die Position richtig platzierter Zellen mit beurteilen. Diese Methode ist mittlerweile von Christian Hennig so weit optimiert worden, dass mit relativ hoher Sicherheit eine Aussage darüber getroffen werden kann, wie viele und welche Zellen vermutlich falsch liegen. Jedoch ergeben sich gerade in der Darstellung dieser Falschlage immer wieder Probleme. So ist z.B. im Laufe dieser Arbeit klar geworden, dass die Ausrichtung der Embryonen eine große Auswirkung auf das Ergebnis haben kann. Dieses spezielle Problem wurde gelöst, indem vor jeder Berechnung die Lage des Embryos iteriert wird. Dabei wird der Embryo so lange gedreht, bis die geringst mögliche Abweichung im RMS zum Wildtyp erreicht wird.

Je mehr unterschiedliche Mutanten analysiert werden, desto mehr scheint sich die Methode zu etablieren. Ohne die bioinformatischen Berechnungen wäre eine ganzheitliche Analyse von Zellfokussierung wahrscheinlich nicht möglich. Für die Zukunft bleibt offen, ob sich das Problem der internen Position klären lässt.

Material und Methoden

Abkürzungsverzeichnis

apx: *anterior pharynx in excess* (Genbezeichnung)

Cl: *Chloroform-Isoamylalkohol*

ddH₂O: bidestilliertes Wasser

dH₂O: destilliertes Wasser

DIC: *differential interference contrast*

egl: *egg laying defective* (hier: Phänotyp; auch als Genbezeichnung)

DNA: *desoxyribonuclein acid*

EMS: *Ethylmethansulfonat*

GFP: *green fluorescent protein*

glp: *abnormal germ line proliferation* (Genbezeichnung)

h: Stunde

l: Liter

let: *lethal* (Genbezeichnung)

min: Minute

ml: Milliliter

mm: Millimeter

nm: Nanometer

ORF: *open reading frame*

par: *abnormal embryonic partitioning of cytoplasm* (Genbezeichnung)

PCI: *Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol*

PCR: *polymerase chain reaction*

RNA: *ribonuclein acid*

RNAi: RNA-Interferenz

rpm: *rotations per minute*

sec: Sekunde

sem: *sex muscle abnormal* (Genbezeichnung)

SWL: single worm lysis

ts: *Temperatur-sensitiv*

üN: über Nacht

WGS: *whole genome sequencing*

YAC: *yeast artificial chromosom*

µl: Mikroliter

µm: Mikrometer

4-D-Mikroskopie (DIC- bzw. Nomarski-Optik)

Bei der 4-D-Mikroskopie werden alle 35 Sekunden in 25 Ebenen durch das Präparat gescannt, wobei in jeder Ebene ein Bild aufgenommen wird.

Präparation der Embryonen:

Hierzu werden zuvor adulte Würmer in ein Uhrglas mit Wasser gegeben und mit einem Skalpell an den beiden Seiten der Gonadenarme aufgeschnitten, so dass die Embryonen aus der Gonade frei ins Wasser abgegeben werden. Anschließend werden die Embryonen

Material und Methoden

des gewünschten Entwicklungsstadiums mit einer Mundpipette aufgenommen und in einem Wassertropfen auf ein 4%-iges Agar-Pad (das auf einem Objektträger liegt) gegeben. Das Wasser wird möglichst komplett abgenommen und die Embryonen möglichst mittig auf dem Agar-Pad positioniert. Hierbei ist es möglich die Embryonen, mit einer an einem Zahnstocher befestigten Wimper, nebeneinander zu legen, sodass man später in einem Bildausschnitt mehrere Embryonen gleichzeitig hat. Liegen die Embryonen in der gewünschten Position, wird vorsichtig ein Deckglas auf das Präparat gelegt, wobei darauf zu achten ist, dass das Deckglas nicht verrutscht, da sonst die Embryonen geschert werden können. Anschließend wird mit der Mundpipette Wasser von der Seite unter das Deckglas gegeben, dies geschieht, damit die Embryonen nicht austrocknen. Das Wasser sollte jedoch nicht das komplette Deckglas ausfüllen, sondern ca. 10%-25% Luft übrig lassen, damit die Embryonen nicht an Sauerstoffmangel sterben. Anschließend wird das Deckglas mit Vaseline versiegelt.

Aufnahme:

Die Aufnahmen erfolgten unter einem Zeiss Axioplan, Zeiss Axioplan II oder Zeiss Examiner. Als Objektiv wurde ein 100-fach APO-Plan Oil benutzt. Nach dem Köhlern des Mikroskops (Leuchtfeld-Blende klein stellen; Kondensor an Leuchtfeld-Blende scharf stellen und Leuchtfeld-Blende in der Mitte des Bildes positionieren; Polarisationsfilter in Position mit höchstem Kontrast stellen; Nomarski-Filter so einstellen, dass Nomarski-Optik erreicht ist (Embryo dunkel, Hintergrund hell); Leuchtfeld-Blende richtig stellen, damit das Bild nicht überbelichtet ist) werden in dem Programm (Ralf Schnabel und Christian Hennig), mit welchem die Aufnahme gesteuert wird, die Parameter festgelegt. Dazu wird zuerst die oberste (Eischale vom Embryo) und die unterste Ebene (ca. 2 μm unterhalb der Ebene, wo die Zelle noch zu erkennen ist) festgelegt. Die Anzahl der Ebenen, die zwischen diesen beiden Ebenen aufgenommen werden sollen können individuell festgelegt werden. Alle Aufnahmen in dieser Arbeit wurden mit der Standard-Einstellung 25 Ebenen (Z-Stapel) gemacht. Dies bedeutet, dass ca. jeden 1 μm -1,2 μm ein Bild gemacht wird. Ebenso als Standard-Einstellung wurde festgelegt, dass alle 35 sec ein Z-Stapel aufgenommen wird. Bei Fluoreszenz-Aufnahmen (Zeiss Axioplan II oder Zeiss Examiner) wurde als Fluoreszenz-Lichtquelle eine LED benutzt. Das Programm ermöglicht es automatische Fluoreszenz-Aufnahmen zu programmieren, so dass nach der gewünschten Anzahl an DIC-Aufnahmen automatisch der Kanal gewechselt wird und eine GFP-Aufnahme folgt.

SIMI°Biocell Zelllinienanalyse

Zur Erstellung der Zelllinie einzelner Embryonen wurde das Programm von SIMI°Biocell verwendet. Dieses Programm ermöglicht es, die einzelnen Bilder der 4-D-mikroskopischen Aufnahmen als Film ablaufen zu lassen und so je einzelne Zelle durch die Zeit und den Raum zu verfolgen. Dabei wird jede Zelle in der mittleren Ebene ihres Zellkerns markiert und erhält so die Raum-Koordinate, die für spätere bioinformatische Analysen genutzt wird. Um eine möglichst hohe Übereinstimmung bei den Zelllinienanalysen zu erhalten, wird eine Mitose jeweils zur Anaphase eingefügt und anschließend drei weitere Zeitpunkte abgewartet, bis die Tochterzellen markiert werden. Diese Übereinstimmung ist besonders für Berechnungen der Migrationswege und Mitose-Winkel wichtig.

RNAi (Injektion und *feeding*)

feeding:

Es werden kleine Platten aus NGM mit Ampicillin (100mM) und IPTG (1mM) gegossen. Die Platten müssen trocknen und können anschließend bei 4°C im Dunkeln gelagert werden. Für den RNAi wird morgens ein *feeding*-Klon in 3ml LB-Medium mit Ampicillin als Vorkultur für 8h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 200µl der Kultur auf eine kleine Platte (RT) angeimpft. Die Platten werden 20min bei RT trocknen gelassen und üN bei RT 12-14h im dunkeln inkubiert. In dieser Zeit werden die Bakterien induziert die *dsRNA* zu synthetisieren. Am nächsten Morgen werden 10-20 Würmer auf eine Platte gesetzt und bei 15°C/25°C inkubiert. Die Würmer werden spätestens alle 24h umgesetzt. Der Zeitpunkt des stärksten Effekts hängt vom jeweiligen Gen ab und kann auch generationsübergreifend sein.

Mikroinjektion:

Bei der Mikroinjektion von *dsRNA* in die Gonade von jungen adulten Würmern wird zunächst der Wurm auf eine 2%-igem, getrockneten Agarose-Pad mit Öl fixiert. Dazu wird der Wurm mit einer Wimper richtig positioniert und leicht an das Pad gedrückt, bis er bewegungsunfähig ist. Anschließend wird mit einer Glaskapillare *dsRNA* unter einem inversen Binokular mit Mikroinjektion-Apparatur in jeden der beiden Gonadenarme injiziert. Dabei ist darauf zu achten, dass weder der Darm punktiert wird, noch zuviel Flüssigkeit injiziert wird. Anschließend wird der Wurm mit einem Tropfen M9-Puffer aus dem Öl geholt und auf eine kleine NGM-Platte mit OP50 zur Regeneration gesetzt. Nach 4-8h wird der Wurm umgesetzt und sollte dann auch anfangen Eier abzulegen.

Methanol-Aceton Fixierung von Embryonen für Antikörperfärbungen

Für die Fixierung von Embryonen für Antikörperfärbungen werden 1-2 gutbewachsene große Platten mit jungen Adulten (bei ts-Mutanten: für min. 24 h vorher auf die restriktive Temperatur (25°C) bringen) abgespült und anschließend mit Hypochlorit-Lösung gebleichen (siehe Bleichen von Würmern). Nach dem Bleichen werden die Embryonen zusätzlich noch 2-3 mal in dH₂O gewaschen und anschließend (je nach Pellet-Größe) in einigen ml dH₂O aufgenommen. In der Zwischenzeit wird 1mg Poly-L-Lysin abgewogen und in 1ml dH₂O gelöst (sehr viskos) und anschließend nochmals verdünnt (1:3 oder 1:1). Die mit Epoxidharz beschichteten 8-Well Objektträger werden mit 96%-Ethanol gereinigt und zum trocknen auf einen 80°C warmen Heizblock gelegt. Anschließend wird der warme, trockene Objektträger mittels eines Ionenbesens mit der 0,25mg/ml oder 0,5mg/ml konzentrierten Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet und zum trocknen erneut auf den Heizblock gelegt. Auf den mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger werden dann ca. 60µl große Tropfen mit der Embryonen-Suspension gegeben. Der Tropfen sollte etwa so viele Embryonen enthalten, dass möglichst viele Embryonen in einem Well nebeneinander liegen, ohne übereinander zu liegen. Wenn die Embryonen sich abgesetzt haben, wird mit der Pipettenspitze möglichst nah an die Oberfläche des Tropfens geprüft, ob die Embryonen am Poly-L-Lysin kleben bleiben, indem durch Luftausstoss mit der Pipette ein Strudel im Tropfen erzeugt wird. Sind die Embryonen nicht fixiert, werden sie vom Boden weggespült. In diesen Fällen wurde anschließend die 1:1 Verdünnung des Poly-L-Lysins benutzt, damit die Embryonen besser haften bleiben. Wenn dies geschehen

Material und Methoden

ist, wird der Wassertropfen mit einer schlackernden Bewegung abgeschlagen und ein 1,5mm Deckglas, so auf den Objektträger gelegt, dass das Deckglas min. 0,5 cm rechts übersteht. Anschließend wird der Objektträger mit dem überstehenden Deckglas für min. 5 min auf einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Metallblock gelegt. Sind die Objektträger durchgefroren, werden sie von dem Metallblock genommen und das überstehende Deckglas wird möglichst schnell abgeschlagen, so dass das Wasser nicht auftauen konnte und die Eischale der Embryonen mit abgerissen wird. Anschließend werden die Objektträger sofort für 15 min in eiskaltes (-20°C) Methanol und weitere 15 min in Aceton (-20°C) gelegt. Danach werden die Objektträger an der Luft getrocknet und können bei -20°C gelagert werden.

Antikörperfärbungen von Embryonen

Zuerst werden die Objektträger (frisch fixiert oder aus 20°C) für 15 min in 1x TBST äquilibriert. Das TBST wird mit einer an einer Wasserstrahlpumpe befestigten, angeschnittenen Pipettenspitze abgesaugt und werden sofort 4µl des Primärantikörpers pro Well auf den Objektträger gegeben. Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Embryonen zu verhindern. Je nach Temperatur beträgt die Inkubationszeit 3h (RT) bis üN (4°C). Im nächsten Schritt werden die Objektträger erneut für 15min in 1x TBST gewaschen, das TBST abgesaugt und 4µl des sekundären Antikörpers auf die Wells gegeben. Die Inkubation erfolgt unter den selben Bedingungen wie bei dem Primärantikörper. Sollte der sekundäre Antikörper Fluoreszenz-gekoppelt sein, ist darauf zu achten, dass die Inkubation im Dunkeln erfolgt. Nach einem 15 minütigem Waschschrift in TBST wird der Puffer abgesaugt, ein 2µl Tropfen TBA-Puffer (Bleichschutz) an den linken Rand der Wells mit Embryonen gegeben und vorsichtig vom linken Rand her ein Deckglas (Ø 1mm) möglichst Luftblasen frei auf den Objektträger gelegt. Um ein Austrocknen des Präparats zu verhindern, wird das Deckglas mit farblosem Nagellack versiegelt.

Single-Worm-Lysis

Es werden 20-50 adulte Würmer von einer Platte gepickt und in 100µl 1x SWL-Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend werden 4µl Proteinase K hinzugegeben und für 60min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Zur Inaktivierung wird für 10min bei 94°C inkubiert. Die Proben können bei -20°C aufbewahrt werden.

Phenolisierung von DNA

Um die SWL-DNA vom Proteinanteil zu trennen, wurde die SWL-DNA-Probe phenolisiert. Zu der Probe wird ein Volumen PCI (25:24:1) hinzugefügt. Anschließend wird die Probe gut vermischt und für 5min bei 13.000rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abgenommen (möglichst ohne Interphase) und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wird 1 Volumen CI (24:1) hinzugegeben und erneut gut vermischt. Die Probe wird erneut für 5min bei 13.000rpm abzentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wird die DNA mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 96%-igem Ethanol ausgefällt. Die DNA wird für 5min bei 13.000rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wird an der Luft getrocknet und anschließend in einem gewünschten Volumen (normalerweise 20µl) ddH₂O oder TE aufgenommen.

Genomische DNA-Isolierung für das WGS (nach O. Hobert)

Acht bis zehn große NGM-Platten mit kleinen Klötzchen des zu sequenzierenden Stammes animpfen. Die Platten möglichst voll mit adulten Würmern bewachsen lassen, aber darauf achten, dass die Platte maximal einen Tag verhungert ist. Besonders darauf achten, dass keine Kontamination auf der Platte ist! Anschließend die Platten mit M9-Puffer abspülen und die Wurm suspension in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführen. Die Würmer für 2-3min bei 4.800rpm abzentrifugieren, den Überstand verwerfen und das Pellet 2-3 mal mit M9-Puffer waschen. Im Anschluss die Würmer in M9-Puffer für 2h auf einer Wippe bei 20°C inkubieren, damit der restliche im Darm befindliche OP50 verdaut werden kann. Erneut das Pellet 2-3 mal mit M9-Puffer waschen und abzentrifugieren. Anschließend soviel Überstand wie möglich abnehmen, ohne das Pellet aufzuwirbeln und das Pellet für mindestens 1h bei -80°C einfrieren. Das Pellet muss mindestens ein Volumen von 500µl haben!

Die DNA-Isolierung wird mit dem Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen, cat# 158622) durchgeführt. Das Wurm-Pellet wird aufgetaut und 3ml Cell-Lysis-Lösung hinzugegeben. Danach werden 15µl Proteinase K (20ml/ml) hinzugefügt und für 5 ½ h im Wasserbad bei 55°C inkubiert, bis alle Würmer komplett lysiert sind. Die Lösung wird zwischenzeitlich invertiert. Dann wird das Lysat auf RT abkühlen gelassen. Es werden 15µl RNase A-Lösung hinzugegeben und für 45min bei 37°C auf einer Wippe inkubiert. Die Lösung wird für 3min auf Eis gekühlt. Dann wird 1ml Protein Precipitation Lösung hinzugegeben und für 20sec bei hoher Geschwindigkeit vermischt. Die Lösung wird für 10min bei 2000g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Es werden 3ml Isopropanol zu dem Überstand gegeben und das Falcon-Röhrchen 50x invertiert. Das DNA-Pellet wird für 3min bei 2000g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wird das Pellet mit 3ml 70%-igem Ethanol vorsichtig gewaschen (nur invertieren!) und erneut für 3min bei 2000g abzentrifugiert. Das Pellet trocknet bei RT und wird danach in 150µl DNA Hydration Lösung aufgenommen und üN bei RT auf einer Wippe gelöst. Ist die Lösung extrem viskos, wird die Lösung mit DNA Hydration Lösung verdünnt. Wenn das Pellet wolkig erscheint, wird anschließend eine Phenolisierung durchgeführt (s.u.). Die DNA wird im Nanodrop vermessen und sollte mindestens eine Konzentration von 500ng/µl und eine OD (260/280) zwischen 1,8 und 2,0 haben. Zur Kontrolle werden 10µl auf ein Agarosegel aufgetragen, um zu kontrollieren, dass die Banden >10kb sind und keine RNA mehr in der Probe enthalten ist. Für die Sequenzierung werden 5µg in 50µl Endvolumen TE aufgenommen.

EMS-Mutagenese und Wurm Vorbereitung für das Sortern

Es werden zehn synchronisierte Platten Wildtyp-Hermaphroditen (möglichst viele L₄-Larven) mit 15ml M9-Puffer abgespült. Die Würmer sedimentieren lassen und je 3 ml Wurm suspension in ein kleines Reagenzglas überführen. Während sich die Würmer erneut absetzen wird in ein neues Reagenzglas 1ml M9-Puffer und 20µl EMS-Lösung (giftig!) gegeben und vermischt. Anschließend wird die verdünnte EMS-Lösung zu der Wurm suspension gegeben und gut vermischt (alle Würmer sollten aufwirbeln). Danach werden für 4h alle 10min die Würmer erneut aufgewirbelt. Anschließend die Würmer erneut am Boden des Reagenzglas sedimentieren lassen und das Wurm-Pellet mit einer

Material und Methoden

Pasteurpipette entnehmen und in einem neuen Reagenzglas auf 1ml dH₂O schichten. Die Würmer durch das Wasser absinken lassen und das Wurm-Pellet erneut mit einer Pasteurpipette abnehmen und viermal mit M9-Puffer waschen. Die Würmer mit einer Pasteurpipette auf große NGM-Platten ausplattieren und 2-3 Stunden bei 15°C sich erholen lassen. Danach werden jeweils 20 L₄-Larven auf eine große NGM-Platte gepickt und wachsen gelassen, bis die F₁-Generation hochgewachsen ist. Von diesen wurden erneut 20-30 Würmer auf eine neue NGM-Platte gepickt und zur Vereinzelung durch den Sorter in die F₂-Generation hochwachsen gelassen.

Wurm-Sortern

Zur Vereinzelung der F₂-Generation wurde ein COPASTM Biosort Worm Sorter der Firma Union Biometrica (mit freundlicher Überlassung von Tony Hyman, MPI Dresden) verwendet. Dazu wurden jeweils drei bis zehn Platten mit dH₂O abgespült und in einem Falcon-Röhrchen sedimentieren gelassen. Anschließend wurde möglichst viel Überstand abgenommen und die Würmer mit dH₂O gewaschen. Dieser Schritt war notwendig, damit möglichst wenig OP50 in den Sorter übertragen wurde, da dieser dazu neigte, in den Schläuchen zu verstopfen. Die Kalibrierung für den Sorter ergab, dass ein Trennungsstrahl-Druck (*sheath*) und einem Probenstrahl-Druck (*sample*) eine Durchflussrate von 9ml/min erreicht wurde, was sich als optimale Einstellung erwies, bei der am wenigsten Fehler auftraten (kein Wurm im Well oder mehr als ein Wurm im Well). Des weiteren wurden die Auswahlkriterien innerhalb des Sorter-Programms so gewählt, dass möglichst nur L₄-Larven oder junge adulte Würmer vereinzelt wurden. Dies war möglich, da der Sorter über einen Laserstrahl in der Durchfluss-Küvette die Größe der Würmer bestimmen kann. Die Würmer wurden dann in 96-Well-Mikrotiterplatten vereinzelt, die zuvor mit 150µl S-Medium befüllt wurden. Die befüllten Mikrotiterplatten wurden anschließend in einem 15°C Klimaraum in Türmen inkubiert. Die Türme wurden mit Autoklavier-Säcken überstülpt, um ein Austrocknen durch die Ventilation zu verhindern.

Replizieren und Auswerten der Mikrotiterplatten

Nach 6-8 Tagen bei einer Inkubation von 15°C, wurden die Mikrotiterplatten repliziert, damit eine Kopie bei 25°C auf den ts-Phänotyp (embryonal letal) getestet werden konnte. Hierzu wurde die Mikrotiterplatten mit einem Roboter der Firma Beckman-Coulter (der AG Robert Geffers, HZI Braunschweig) repliziert. Hierzu wurden den Original-Platten 40µl Wurmssuspension entnommen und in eine neue 96-Well-Mikrotiterplatte übertragen. In diese wurden zuvor 100µl S-Medium vorgelegt. Zwischen den einzelnen Replizier-Schritten wurden die Pipettenspitzen jeweils mit Hypochlorit-Lösung gespült, um eine Kreuzkontamination der Mutanten-Stämme zu verhindern. Nach einer anschließenden Inkubation bei 25°C für 6-8 Tage, wurden alle Kopien unter einem Binokular für jedes Well angeschaut und mögliche ts-Kandidaten markiert. Danach wurde auf die Original-Platte bei 15°C zurückgegriffen und die Kandidaten isoliert und in eine neue Mikrotiterplatte mit frischem S-Medium (1. ts-Test) oder eine kleine NGM-Platte (2.ts-Test) übertragen.

OP50 Anzucht und Lagerung

Für ein 50ml Falcon-Röhrchen mit OP50 für das S-Medium werden 250 ml Vorkulturen in DYT angeimpft, die für ca. 8h bei 37°C auf einem Schüttler in Erlenmeyerköben mit

Material und Methoden

Schikane angewachsen. Mit 50ml der Vorkultur wurden 1l Hauptkulturen angeimpft, die 2 Tage bei 37°C schütteln. Anschließend werden die Hauptkulturen 2 Tage bei 4°C ruhen gelassen, damit sich die Bakterien absetzen können. Mit einer Wasserstrahlpumpe wird möglichst viel Medium abgesaugt (ca. 800-900ml). Das Bakterienpellet wird mit dem restlichen Überstand aufgenommen und die Suspension für 5 min bei 1000rpm(?) abzentrifugiert. Das Pellet von 3l Hauptkultur wird leicht getrocknet und anschließend in 2ml-5ml frischem LB-Medium aufgenommen, in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt und bei -20°C gelagert.

Kultivierung von *C. elegans*

Die Haltung von *C. elegans* erfolgt auf NGM-Platten, auf deren kompletter Oberfläche *E. coli* OP50 wächst. Um Pilzbefall zu verhindern, enthalten die Platten zusätzlich das Fungizid Nystatin, welches für *C. elegans* und *E. coli* unschädlich ist. Sind keine Bakterien mehr auf der Platte, bildet *C. elegans* Dauerlarven und kriecht in den Agar. Die Dauerlarven sind in der Lage mehrere Monate ohne Nährstoffe auszukommen und die Würmer können so in Dauerkulturen im Inkubator gehalten werden. Um erneut eine wachsende Kultur zu erhalten, wird ein Klötzchen aus dem Agar geschnitten und auf eine neue beimpfte NGM-Platte gelegt. Die Würmer kriechen aus dem Agar und entwickeln sich unter neuem Futter normal weiter und legen nach 1-2 Tagen Eier ab.

Komplementationstests und Kartierungskreuzungen

Komplementationstest von ND 20 G7 mit *apx-1(t2063)*

Leider war es nicht möglich, die beiden Stämme homozygot ineinander zu kreuzen. Das lag unter anderem daran, dass das bekannte *apx-1(t2063)*-Allel eine nicht konditionale, embryonal letale Mutation ist. Dies bedingt, damit der Stamm erhalten werden kann, dass das Allel genetisch balanciert werden muss. Dazu stehen in *C. elegans* sogenannte Balancer-Stämme zur Verfügung. Diese Stämme tragen, durch Chromosomen-Brüche induziert, chromosomale Translokationen oder Inversionen. Diese Veränderungen führen dazu, dass in diesen Stämmen, dort wo Translokationen oder Inversionen stattgefunden haben, während der Meiose keine Rekombination stattfinden kann, da die Schwesterchromatiden unterschiedliche Sequenzen haben. So bleiben Mutationen in dem Stamm erhalten, die unter normalen Umständen innerhalb kürzester Zeit aufgrund von Selektionsnachteilen (in diesem Fall: Tod) innerhalb einer Population aussterben würden. In dem von mir verwendeten Stamm wird *apx-1(t2063)* (Chromosom V) von nT1 balanciert. nT1 ist ein Balancer-Stamm, bei dem eine Translokation von Chromosom IV und V induziert wurde (MT1000 Horvitz wormbase).

Um die Wildtyp-Chromosomen erkennen zu können, sind auf diesen sichtbar Marker (rezessive Mutationen mit einer phänotypischen Ausprägung im adulten Wurm). Selbst die Balancer-Hermaphroditen segregieren sie, den Mendelschen Regeln widersprechend, in 80% Wildtypen (heterozygot balanciert) und 20% Marker-Phänotypen (Abbildung M1).

Material und Methoden

		+	M		+		
+	M						
	M						
+							

Abbildung M1: Schema einer Balancer-Selbstung.

In dem Schema sind alle Gameten aufgetragen, die bei der Selbstung von Hermaphroditen, die Balancer-Chromosomen haben, auftreten können. Damit das Wildtyp-Chromosom zu erkennen ist, ist auf diesem eine Marker-Mutation (M). Alle Nachkommen, die abweichend von dem Ausgangsstamm mehr oder weniger als jeweils eines der Balancer-Chromosomen haben, sind nicht lebensfähig (Rotes Kreuz). Von den überlebenden Nachkommen, haben 20% keine Balancer-Chromosomen und sind homozygot für den Marker (Grüner Kasten).

Alle anderen Chromosomen-Kombinationen sind tödlich, da durch die Translokation von einigen Teil-Chromosomen nur eine Kopie vorhanden ist, wogegen von anderen dementsprechend drei Kopien vererbt werden.

In diesen Stamm kreuzte ich meinen Stamm ND_20_G7 rein. Da ich dazu eine große Anzahl an Männchen benötigte, musste ich mir zuvor einen Männchen-Stamm herstellen. Bei *C. elegans* treten normalerweise nur spontan Männchen auf. Die einzige Möglichkeit für einen Männchen-Stamm ist, zufällig auftretenden Männchen (1%) mit Hermaphroditen zu kreuzen. Da ich keine homozygoten Männchen finden konnte, habe ich in den Stamm Wildtyp-Männchen reingekreuzt und die heterozygoten F1-Männchen für die Kreuzung genutzt. Dies bedeutete für den Komplementationstest jedoch, dass zusätzlich zu dem *apx-1*-Allel, dem Balancer-Chromosom und meinem neuen Allel auch noch ein Wildtyp-Chromosom mit vererbt werden kann (Abbildung M2).

Material und Methoden





		+	ND	+	+
<i>unc-24</i>	<i>apx-1</i>	+	ND	+	+
		<i>unc-24</i>	<i>apx-1</i>	<i>unc-24</i>	<i>apx-1</i>
	<i>apx-1</i>	+	ND	+	+
		<i>unc-24</i>	<i>apx-1</i>	<i>unc-24</i>	<i>apx-1</i>
<i>unc-24</i>		+	ND	+	+
		<i>unc-24</i>	<i>apx-1</i>	<i>unc-24</i>	<i>apx-1</i>
		+	ND	+	+
		<i>unc-24</i>	<i>apx-1</i>	<i>unc-24</i>	<i>apx-1</i>

Abbildung M2: Schema zur Kreuzung des balancierten *apx-1* Stammes mit heterozygoten ND_20_G7-Männchen.

Die Hälfte der Nachkommen ist nicht lebensfähig, da sie nur ein Balancer-Chromosom vererbt bekommen haben (Rotes Kreuz). Die anderen vier Kombinationen sehen wie Wildtypen aus. Werden die F₁-Würmer bei 25°C inkubiert, legt ein viertel der Würmer nur tote Eier (Grüner Kasten) sollte es sich bei ND_20_G7 um ein Allel von *apx-1* handeln.

Kartierung von *t3205* auf Chromosom II

MS III hat den Phänotyp [*dpy-5*^l *unc-4*^l *lon-1*^l] und wird in der klassischen *C. elegans* Genetik zum lokalisieren einer Mutation auf ein Chromosom genutzt. Ein weiterer Stamm MS II deckt die Chromosomen IV, V und X ab. Das Prinzip hinter dieser Kreuzung ist, sollte die Mutation nicht auf einem der Chromosomen liegen (also ungekoppelt), die Phänotypen nach den mendelschen Regeln in der F₂ 3:1 segregieren und man ¼ der phänotypischen Mutation erwartet, die Temperatur sensitiv sind (*t3205* Phänotyp). Im Falle einer Kopplung (beide Mutationen liegen auf demselben Chromosom) muss es während der Meiose zu einer Rekombination zwischen den beiden Genen kommen, damit der kombinierte Phänotyp mutant und Temperatur sensitiv auftritt. Da dieses Ereignis jedoch maximal zu 50% auftritt und die Wahrscheinlichkeit, mit zunehmender Nähe der Gene zueinander, abnimmt, kann man durch das Auftreten der rekombinanten Phänotypen schließen, ob die beiden Gene gekoppelt oder ungekoppelt vorliegen müssen (Tabelle M1).

Tabelle M1: Punnett-Quadrat der F₂ zu der 4-Faktorkreuzung von MSIII mit *t3205* und einer Kopplung der Mutation an Chromosom II.

In der linken Spalte und ersten Zeile sind jeweils (**fett**) alle möglichen Gameten aufgetragen, die von der F₁-Generation gebildet werden können. In *kursiv* alle möglichen Rekombinanten angegeben, zudem sind alle Nachkommen (in den eckigen Klammern ist nur der Phänotyp angegeben), die min. ein rekombinantes Chromosom enthalten, auch *kursiv*. Als letztes wurden die Rekombinanten, die den doppelt-mutanten Genotyp, sowie alle Nachkommen, die den doppelt-mutanten Phänotyp zeigen, grün eingefärbt. Die Kopplung der *ts*-Mutation an *unc-4* auf Chromosom II ist durch eine runde Klammer angedeutet. Von den 256 möglichen Kombinationen sind jeweils 36 Kombination mit einem homozygoten Marker (15°C). Inkubiert man diese Würmer bei 25°C sind von den 36 Würmern 9 Würmer zudem Temperatur-sensitiv sind (25%). Dies ist allerdings nur der Fall, wenn die beiden Mutationen auf zwei unterschiedlichen Chromosomen liegen. Sind die Mutationen gekoppelt, kann eine Doppel-Mutation nur durch Rekombination auftreten. Da die Rekombinationswahrscheinlichkeit unter 50% liegt, und mit räumlicher Nähe der beiden Gene zueinander weiter abnimmt, weicht hier die Häufigkeit einer Doppel-Mutante deutlich von 25% ab.

	+ (+ unc) lon	dpy (+ unc) lon	dpy (+ unc) +	+ (+ unc) +
+ (ts +) lon	[lon]	[lon]	[+]	[+]
dpy (+ unc) lon	[unc lon]	[dpy unc lon]	[dpy unc]	[unc]
dpy (+ unc) +	[unc]	[dpy unc]	[dpy unc]	[unc]
+ (+ unc) +	[unc]	[unc]	[unc]	[unc]
+ (+ unc) lon	[unc lon]	[unc lon]	[unc]	[unc]
dpy (ts +) lon	[lon]	[dpy lon]	[dpy]	[+]
+ (ts +) +	[+]	[+]	[+]	[+]
dpy (ts +) +	[+]	[dpy]	[dpy]	[+]
+ (ts unc) +	[unc]	[unc]	[unc]	[unc]
+ (+ +) lon	[lon]	[lon]	[+]	[+]
dpy (+ +) +	[+]	[dpy]	[dpy]	[+]
dpy (+ +) lon	[lon]	[dpy lon]	[dpy]	[+]
+ (+ +) +	[+]	[+]	[+]	[+]
+ (ts unc) lon	[unc lon]	[unc lon]	[unc]	[unc]
dpy (ts unc) lon	[unc lon]	[dpy unc lon]	[dpy unc]	[unc]
dpy (ts unc) +	[unc]	[dpy unc]	[dpy unc]	[unc]

	+ (ts +) lon	dpy (ts +) lon	+ (ts +) +	dpy (ts +) +
+ (ts +) lon	[ts lon]	[ts lon]	[ts]	[ts]
dpy (+ unc) lon	[lon]	[dpy lon]	[+]	[dpy]
dpy (+ unc) +	[+]	[dpy]	[+]	[dpy]
+ (+ unc) +	[+]	[+]	[+]	[+]
+ (+ unc) lon	[lon]	[lon]	[+]	[+]
dpy (ts +) lon	[ts lon]	[dpy ts lon]	[ts]	[dpy ts]
+ (ts +) +	[ts]	[ts]	[ts]	[ts]
dpy (ts +) +	[ts]	[dpy ts]	[ts]	[dpy ts]
+ (ts unc) +	[ts]	[ts]	[+]	[ts]
+ (+ +) lon	[lon]	[lon]	[+]	[+]
dpy (+ +) +	[+]	[dpy]	[+]	[dpy]
dpy (+ +) lon	[lon]	[dpy lon]	[+]	[dpy]
+ (+ +) +	[+]	[+]	[+]	[+]
+ (ts unc) lon	[ts lon]	[ts lon]	[ts]	[ts]
dpy (ts unc) lon	[ts lon]	[dpy ts lon]	[ts]	[dpy ts]
dpy (ts unc) +	[ts]	[dpy ts]	[ts]	[dpy ts]

	+ (+ +) +	+ (+ +) lon	dpy (+ +) +	dpy (+ +) lon
+ (ts +) lon	[+]	[lon]	[+]	[lon]
dpy (+ unc) lon	[+]	[lon]	[dpy]	[dpy lon]
dpy (+ unc) +	[+]	[+]	[dpy]	[dpy]
+ (+ unc) +	[+]	[+]	[+]	[+]
+ (+ unc) lon	[+]	[lon]	[+]	[lon]

Material und Methoden

dpy (ts +) lon	[+]	[lon]	[dpy]	[dpy lon]
+ (ts +) +	[+]	[+]	[+]	[+]
dpy (ts +) +	[+]	[+]	[dpy]	[dpy]
+ (ts unc) +	[+]	[+]	[+]	[+]
+ (+ +) lon	[+]	[lon]	[+]	[lon]
dpy (+ +) +	[+]	[+]	[dpy]	[dpy]
dpy (+ +) lon	[+]	[lon]	[dpy]	[dpy lon]
+ (+ +) +	[+]	[+]	[+]	[+]
+ (ts unc) lon	[+]	[lon]	[+]	[lon]
dpy (ts unc) lon	[+]	[lon]	[dpy]	[dpy lon]
dpy (ts unc) +	[+]	[+]	[dpy]	[dpy]

	+ (ts unc) +	+ (ts unc) lon	dpy (ts unc) lon	dpy (ts unc) +
+ (ts +) lon	[ts]	[ts lon]	[ts lon]	[ts]
dpy (+ unc) lon	[unc]	[unc lon]	[dpy unc lon]	[dpy unc]
dpy (+ unc) +	[unc]	[unc]	[dpy unc]	[dpy unc]
+ (+ unc) +	[unc]	[unc]	[unc]	[unc]
+ (+ unc) lon	[unc]	[unc lon]	[unc lon]	[unc]
dpy (ts +) lon	[ts]	[ts lon]	[dpy ts lon]	[dpy ts]
+ (ts +) +	[ts]	[ts]	[ts]	[ts]
dpy (ts +) +	[ts]	[ts]	[dpy ts]	[dpy ts]
+ (ts unc) +	[ts unc]	[ts unc]	[ts unc]	[ts unc]
+ (+ +) lon	[+]	[lon]	[lon]	[+]
dpy (+ +) +	[+]	[+]	[dpy]	[dpy]
dpy (+ +) lon	[+]	[lon]	[dpy lon]	[dpy]
+ (+ +) +	[+]	[+]	[+]	[+]
+ (ts unc) lon	[ts unc]	[ts unc lon]	[ts unc lon]	[ts unc]
dpy (ts unc) lon	[ts unc]	[ts unc lon]	[dpy ts unc lon]	[dpy ts unc]
dpy (ts unc) +	[ts unc]	[ts unc]	[dp ts unc]	[dpy ts unc]

Da *glp-1* auf Chromosom III und *apx-1* auf Chromosom V liegt, war es nicht möglich beide Möglichkeiten mit einer Kreuzung zu testen. Da jedoch der Stamm MS II nicht korrekt segregierte und neu aufgetaut werden musste, wurde zunächst nur mit MS III gekreuzt.

Kreuzen von *C. elegans*

Um eine Kreuzung anzusetzen, werden je 5 L₄-Larven mit 15 Männchen zusammen auf eine kleine Platte gesetzt und bei 15°C inkubiert. Nach 2-3 Tagen werden die Hermaphroditen auf kleine Platten vereinzelt. Nach 5-7 Tagen (Generationszeit von *C. elegans* bei 15°C) wird die F₁-Generation kontrolliert, dass 50% der Nachkommen Männchen sind. Die Hermaphroditen, auf deren Platten keine oder wenig Männchen geschlüpft sind, wurden nicht von Männchen befruchtet und werden aussortiert. Beim Auskreuzen werden von Platten mit gekreuzten Hermaphroditen insgesamt 10 L₄-Larven vereinzelt. Von der F₂-Generation werden im nächsten Schritt insgesamt 20 L₄-Larven vereinzelt und bei 15°C bis in die nächste Generation hochwachsen gelassen. Diese F₃-Generation wird erst auf ts getestet, indem 5 L₄-Larven üN bei 25°C inkubiert werden. Nur Würmer von Platten, die 100% tote Nachkommen legen sind für die rezessive ts-Mutation

Material und Methoden

homozygot und man kann nun auf die Ausgangsplatte bei 15°C zurückgreifen.

Transformation mittels der Helium-Partikel-Kanone

Für einen Schuss werden 1-2 große, gut bewachsene Platten mit M9-Puffer abgespült und die Würmer werden synchronisiert. Außerdem werden kleine Platten mit je einem 15µl-20µl Tropfen OP50 angeimpft und üN bei RT getrocknet. Anschließend können die Platten bei 4°C gelagert werden.

Zu Beginn der Transformation werden die kleinen Platten auf Eis gestellt, damit später das Wurm-Pellet erstarrt. Große NGM-Platten werden aus dem 4°C-Inkubator genommen und bei RT angewärmt. In der Zwischenzeit wird 1mg Goldpartikel in ein 1,5ml Reaktionsgefäß abgewogen. Es werden 100µl Spermidinlösung zu dem Gold gegeben und für 10sec in einem Ultraschallbad suspendiert. Anschließend wird die Lösung 10min bei RT inkubiert und zwischenzeitlich 3-4 mal aufgeschüttelt. Nach der Inkubation werden 16µg DNA (bei Ko-Transformationen die DNAs vorher mischen!) hinzugegeben. Das Gesamt-Volumen darf nicht 100µl überschreiten. Die Lösung wird erneut 10min bei RT (unter gelegentlichem Aufschütteln) inkubiert. Die Inkubationszeit wird genutzt, die angewärmten NGM-Platten vor zu beschriften. Das DNA-Goldgemisch wird dann mit dH₂O auf 360µl aufgefüllt und nochmals für 10min bei RT (unter Aufschütteln) inkubiert. Während dieser Inkubationszeit werden die synchronen, jung-adulten Würmer mit M9-Puffer von ihren Platten gespült und in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt. Dort lässt man die Würmer sedimentieren. Nach der 10 minütigen Inkubation werden 100µl CaCl₂-Lösung tropfenweise zu dem DNA-Goldgemisch gegeben und kurz gemischt. Die Lösung präzipitiert für 10min bei RT (ohne Aufschütteln!). Während dieser Zeit wird der M9-Überstand von den sedimentierten Würmer abgenommen und die Würmer mit einer abgeschnitten gelben Spitze (weniger Scherkräfte!) in 20µl Tropfen auf den OP50-Tropfen der vorgekühlten kleinen NGM-Platten gegeben. Die kleinen Platten werden nicht bewegt, bis das Wurm-Pellet fest ist. Da das Pellet nicht zu dicht sein darf, muss in den meisten Fällen das Wurmsediment verdünnt werden, bevor es als 20µl Tropfen auf den OP50-Tropfen gegeben wird. Hierzu werden zuvor 100µl Wurm-Pellet mit 50µl M9-Puffer verdünnt. Das Pellet ist richtig, wenn die Würmer in zwei-drei Lagen übereinander liegen. Das DNA-Gold-Präzipitat wird für 25sec bei 13.000rpm abzentrifugiert und dreimal mit 1ml 96%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 200µl PVP-Lösung resuspendiert.

Vor der Transformation muss zunächst die Helium-Flasche an den Zylinder der Kanone angeschlossen werden. Der Metallfilter wird in die untere Hälfte des Filterhalters eingelegt und der Dichtungsring daraufgelegt. Die obere Hälfte des Filterhalters wird mit dem Gewinde drauf geschraubt und in die Kanone eingespannt. Anschließend wird die Kanone zwei- bis dreimal ausgelöst, um den restlichen Ethanol zu entfernen. Für einen Schuss wird 20µl DNA-Goldgemisch-Suspension mittig auf das Sieb des Filterhalters pipettiert und in die Kanone eingebaut. Eine kleine Platte mit Wurm-Pellet wird so unter die Kanone gestellt, dass das Pellet mittig beschossen wird. Anschließend wird der Plexiglas-Zylinder eingebaut und das Vakuum angeschlossen. Ausgelöst wird bei -0,4 bar. Der Zylinder wird geöffnet und das Vakuum ausgestellt. Die kleine Platte wird weiter auf Eis gelagert, bis alle Schüsse beendet sind und ausplattiert werden können. Je nach Stamm werden die kleinen Platten geviertelt, gesechstelt oder geachtelt. Zur Regeneration und in Abhängigkeit der ts-Kurve werden die Würmer zunächst bei 15°C inkubiert. Handelt es

Material und Methoden

sich um ts-Allele werden die Würmer zum ersten Zeitpunkt umgestellt, an dem sie das Genprodukt in ihrer Entwicklung nicht mehr brauchen. Nach 1-2 Wochen werden die Schüsse ausgewertet.

ts-Kurve

Eine ts-Kurve erstellt man, indem man die Embryonen zu definierten Zeitpunkten von der permissiven auf die restriktive Temperatur bringt (*up-shift*) oder umgekehrt (restriktiv → permissiv: *down-shift*). Wird das Protein zu dem Zeitpunkt des Temperaturwechsels benötigt, sterben alle Embryonen (*up-shift*). Ist dies nicht der Fall, schlüpfen Larven. Hierzu werden adulte Würmer mit Embryonen in der Gonade in einem Uhrglas mit destilliertem Wasser aufgeschnitten und die Embryonen ihrem Stadium (30 pro Stadium) entsprechend auf NGM-Platten (ohne OP50) sortiert und sofort auf die gewünschte Temperatur gebracht. Die Platten werden nach 24h-48h ausgewertet.

Synchronisieren von Wurmkulturen

Zur Synchronisierung einer Wurmkultur werden gut bewachsene Platten mit möglichst vielen adulten Würmern gebleichen (siehe Bleichen von Würmern). Nachdem die isolierten Embryonen in M9-Puffer schwimmen, wird das Falcon-Röhrchen üN bei 15°C auf einer Wippe inkubiert. Am nächsten Morgen wird kontrolliert, dass möglichst alle Eier geschlüpft sind und als L₁-Larven in dem Puffer arretieren. Ist dies der Fall, werden die Larven mit einer Pasteur-Pipette tropfenweise auf große NGM-Platten verteilt. Dabei ist darauf zu achten, dass nicht zu viele Larven auf eine Platte gegeben werden, da sonst der OP50 nicht für alle Würmer reicht. Die Anzahl der Tropfen pro Platte hängt von der Konzentration der Larven pro Tropfen ab.

Bleichen von Würmern

Für das Bleichen von Würmern, werden von gut bewachsenen Platten (die nicht verhungert sind) mit 3-5ml M9-Puffer alle Würmer von den Platten gespült und in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Nachdem die Würmer sich am Boden abgesetzt haben, wird so viel Überstand wie möglich abgenommen, ohne das Pellet zu zerstören. Das Pellet wird mit Hypochlorit-Lösung auf 5ml aufgefüllt und für 2min heftig per Hand geschüttelt. Bei Kontrolle unter dem Binokular sollten die Würmer tot als Stäbchen in dem Hypochlorit schwimmen. Anschließend wird das Hypochlorit sofort für 1min bei 4800rpm abzentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Pellet wird mit M9-Puffer auf 5ml aufgefüllt, resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Hypochlorit-Schritt wird wiederholt, allerdings wird diesmal so lange geschüttelt, bis die Wurmhüllen sich aufgelöst haben und nur noch Embryonen in der Lösung schwimmen. Dies dauert ca. 1,5-2min. Das Hypochlorit wird abzentrifugiert und die Embryonen werden 2-3 mal in M9-Puffer gewaschen. Kontrolliert man die Embryonen-Suspension sollten die meisten Eier frei schwimmen. Haben sich Klumpen gebildet bedeutet dies meist, dass die Eischale der Embryonen angegriffen ist und die meisten Embryonen wahrscheinlich tot sind.

Aufreinigung von Stämmen

Zum Aufreinigen werden 5-10 adulte Würmer mit vielen Eiern in der Gonade von der verunreinigten Platte gepickt und in einen Tropfen Hypochlorit-Lösung, der auf den

Material und Methoden

umgedrehten Deckel der Platte gegeben wurde, abgestrichen. Die Hermaphroditen werden in dem Tropfen an ihren Gonaden aufgeschnitten, bis möglichst alle Eier im Hypochlorit sind. Zu dem Tropfen Hypochlorit werden 2 Tropfen M9-Puffer gegeben und die Tropfen 2-3 mal hochgesaugt, bis sich alles gut vermischt hat. Anschließend wird alles auf eine frische Platte gegeben und nach 1 Woche kontrolliert, dass Würmer geschlüpft sind und keine Kontamination mehr hochwächst.

Stämme, die das Bleichen nicht überleben, kann man versuchen aufzureinigen, indem man L₄-Larven von der kontaminierten Ausgangsplatte vereinzelt und ca. alle 12 Stunden auf eine neue nicht kontaminierte Platte transferiert bis keine Verunreinigungen mehr hochwachsen.

PCR-Ansatz (SNP-Mapping)

1µl DNA (c= 0,1µg/µl)

5µl 10x Taq-Puffer

4µl dNTPs (2,5M)

1µl Primer I

1µl Primer II

38 µl ddH₂O

0,25µl TaKaRa Ex Taq

Programm:

Deckel 105°C

- | | | | | |
|----|------|------|-------------------|-----------------------------|
| 1) | 2min | 94°C | denaturieren | |
| 2) | 30s | 94°C | denaturieren | |
| 3) | 30s | 55°C | binden der Primer | Schritt 2-4 30x wiederholen |
| 4) | 2min | 72°C | elongieren | |
| 5) | 6min | 72°C | elongieren | |
| 6) | ∞ | 4°C | | |

Zur Kontrolle wird das PCR-Produkt neben einem geeigneten Größenstandard auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Alle Agarosegele zur Kontrolle werden mit 0,5x TBE-Puffer angesetzt.

Bearbeitung der Rohdaten (siehe Abbildungen 50 und 51) WGS *t3206* (nach Anleitung von M. Doitsidou)

Zuerst wurde in einer neuen Spalte die Spalte [snp reads] durch die Spalte [all reads] geteilt (Abbildung 50). Anschließend wurde das Dokument nach der neuen Spalte der Zahlen-Größe nach sortiert und alle Einträge <0,2 und >0,6 gelöscht. Im Anschluss wurde das Dokument nach der Spalte [snp reads] der Zahlen-Größe nach sortiert und alle Einträge < 3 gelöscht. Dadurch konnten die beiden Bereiche festgelegt werden, an denen die Verteilung der SNPs vom 1:1 Verhältnis zwischen N2 und CB4856 abweicht. Anschließend wurden alle Gene aus dem Dokument mit den Protein-Varianten (Abbildung 51) gelöscht, die dieselbe Mutation bei der Sequenzierung von *t3219* angaben. Die übrigen Protein-Varianten in den beiden SNP-freien Bereichen wurden als Kandidatengene für *t3206* in Betracht gezogen.

Material und Methoden

Lösungen und Medien

M9-Puffer

3g KH_2PO_4
6g Na_2HPO_4
5g NaCl
1ml 1 M MgSO_4 -Lösung
auf 1.000ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren

S-Basal

5,85g NaCl
1g K_2HPO_4
6g KH_2PO_4
1ml Cholesterin-Lösung (5mg/ml in Ethanol)
auf 1.000ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren

Spurenelemente-Lösung

1,86g EDTA
0,69g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0,2g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
0,29g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0,025g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
auf 1.000ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren
Im Dunklen lagern

Kaliumcitrat pH 6

20g Zitronensäure-Monohydrat
293,5g Tri-Kaliumcitrat-Monohydrat
auf 1.000ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren

S-Medium

1l S-Basal
10ml 1 M Kaliumcitrat pH 6
10 ml Spurenelemente-Lösung
3ml 1 M CaCl_2
3ml 1 M MgSO_4
10ml OP50-Lösung
Lösungen steril zu dem Liter S-Basal geben. Nicht autoklavieren
1M Kalziumchlorid
55,5g CaCl_2
auf 1.000ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren

MgSO_4 -Lösung

120,37g MgSO_4
auf 1.000ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren

Hypochlorit-Lösung

6ml HOCl
2,5ml 5 N KOH

Material und Methoden

auf 50ml mit dH₂O auffüllen

4x TBST-Puffer

30,26g Tris

43,83g NaCl

pH 7,4 einstellen

auf 1.000ml mit dH₂O auffüllen und autoklavieren

0,25% (v/v) Tween 20 zugeben

TBA-Puffer

7ml 1,2-Propandiol

2g TBA (2,3-t-Butyl-4-Hydroxyanisol)

0,6g n-Propylgallat

400µl 0,1 M Natriumazid

auf 10ml mit dH₂O auffüllen, bei 4°C lagern

PVP-Lösung

10 mg Polyvinylpyrrolidon (Molekulargewicht 360.000)

500 µl dH₂O, lösen

auf 100 ml mit abs. Ethanol auffüllen

5x TBE-Puffer

54g Tris

27,5g Borsäure

20ml 0,5 M EDTA pH 8,0

auf 1.000ml mit dH₂O auffüllen und autoklavieren

Single-Worm-Lysis-Puffer

50 mM KCl

10 mM TrisCl pH 8,3

2,5 mM MgCl₂

0,45 % (v/v) NP40 oder Triton X100

0,45 % (v/v) Tween 20

50x TAE-Puffer

242g Tris

57,1ml Eisessig

100ml 0,5 M EDTA

auf 1.000ml mit dH₂O auffüllen und autoklavieren

NGM-Medium

6g NaCl

10g fettes Pepton (Bacto Peptone von Difco)

29g Agar

Material und Methoden

2ml Cholesterin-Lösung

auf 2.000ml auffüllen und autoklavieren, danach noch zugeben:

10ml 0,1 M CaCl_2

10ml 0,1 M MgSO_4

50ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0

10ml Nystatinlösung (1% Stammlösung)

10ml 20% Succrose-Lösung (große Platten)

LB-Medium

10g Trypton

5g Hefeextrakt

5g NaCl

15g Agar (für Platten)

pH 7,5 einstellen

auf 1.000ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren

4% Agar für Agarpads (4-D-Mikroskopie)

4g auf 100ml mit dH_2O auffüllen und in Mikrowelle aufkochen lassen

In sterile Reagenzgläser überführen und luftdicht verschliessen.

TE-Puffer

10 mM Tris

1 mM EDTA

pH 8,0 einstellen

auf 1.000 ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren

DYT

16g Trypton

10g Hefeextrakt

5g NaCl

auf 1.000ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren

Verwendete Wurm-Stämme:

CGC Bezeichnung	Genotyp
MS I	<i>unc-5(e53)^{IV}; dpy-11(e224)^V; lon-2(e278)^X</i>
MS III	<i>dpy-5(e61)^I; unc-4(e120)^{II}; lon-1(e185)^{III}</i>
HS732	<i>wrm-1(tm514) III/hT2[bli-4(e937) let-?(q782) qIs48] (I;III)</i>
N2 (Bristol)	Wildtyp
CB4856 (Hawaii)	Wildtyp
-	<i>sem-4(tm547)</i>
GE 68	<i>glp-1(e2144)</i>
-	<i>apx-1(t2063)</i>

Material und Methoden

-	let-19(t3219)
---	---------------

Verwendete Bakterienstämme (*E. coli*):

- HT115 (DE3) *F*-, *mcrA*, *mcrB*, *IN(rrnD-rrnE)1*, *lambda* -, *rnc14::Tn10*(DE3 lysogen: *lavUV5 promoter -T7 polymerase*) (*IPTG-inducible T7 polymerase*) (*RNase III minus*)
- OP50 *Uracil auxotroph*

Literaturverzeichnis

- Basson M, Horvitz HR** (1996). The *Caenorhabditis elegans* gene *sem-4* controls neuronal and mesodermal cell development and encodes a zinc finger protein. *Genes Development* **10**, 1953-1965.
- Bignone FA** (2001). Structural complexity of early embryos: a study of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biology Phys.* **27**, 257–283.
- Bischoff M, Schnabel R** (2006). A posterior centre establishes and maintains polarity of the *Caenorhabditis elegans* embryo by a Wnt-dependent relay mechanism. *PLoS Biology* **4**, e396.
- Borggreffe T, Yue X** (2011). Interactions between subunits of the Mediator complex with gene-specific transcription factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22(7)**, 759-68.
- Brenner S** (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Brunschwig K, Wittmann C, Schnabel R, Bürglin TR, Tobler H, Müller F** (1999). Anterior organization of the *Caenorhabditis elegans* embryo by the *labial-like* Hox gene *ceh-13*. *Development* **126(7)**, 1537-1546.
- Casamassimi A, Napoli C** (2007). Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: An overview. *Biochimie* **89**, 1439-1446.
- Clayton JE, van den Heuvel SJL, Saito RM** (2008). Transcriptional control of cell-cycle quiescence during *C. elegans* development. *Developmental Biology* **313**, 603–613.
- Deutsch JS** (2010). Homeiosis and beyond. What is the function of the hox genes? *Hox Genes: Studies from the 20th to 21th Century* **Chapter 12**, 155-165.
- Doitsidou M, Poole RJ, Sarin S, Bigelow H, Hobert O** (2010). *C. elegans* mutant identification with a one-step whole-genome-sequencing and SNP mapping strategy. *PLoS One* **5(11)**, e15435.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J** (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systemic RNA interference. *Nature* **408(6810)**, 325-330.

- Freeze HH** (2009). Towards a therapy for phosphomannomutase 2 deficiency, the defect in CDG-Ia patients. *Biochimie Biophys. Acta* **1792**(9), 835-40.
- Grant K, Hanna-Rose W, Han M** (2000). *sem-4* promotes vulval cell-fate determination in *Caenorhabditis elegans* through regulation of *lin-39* Hox. *Developmental Biology* **224**, 496–506.
- Harris J, Honigberg L, Robinson N, Kenyon C** (1996). Neuronal cell migration in *C. elegans*: regulation of Hox gene expression and cell position. *Development* **122**(10), 3117-3131.
- Hintze A** (2006). Charakterisierung der Musterbildung durch Zellwanderungen in *Caenorhabditis elegans*. *Dissertation*.
- Hutter H, Schnabel R** (1994). *glp-1* and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. *Development* **120**, 2051–2064.
- Hutter H, Schnabel R** (1995). Establishment of left-right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a multistep process involving a series of inductive events. *Development* **121**, 3417-24.
- Hutter H, Schnabel R** (1995). Specification of anterior-posterior differences within the AB lineage in the *C. elegans* embryo: a polarising induction. *Development* **121**, 1559-68.
- Jürgens G** (1988) Head and tail development of the *Drosophila* embryo involves *spalt* a novel homeotic gene. *EMBO Journal* **7**, 189-196.
- Kaletta T, Schnabel H, Schnabel R** (1997). Binary specification of the embryonic lineage in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **390**, 294– 298.
- Kamath RS, Ahringer J** (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-21.
- Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M et al.** (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231-7.
- Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J** (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0002.
- Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS** (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**(3), 311-320.

- Kühnlein RP, Brönner G, Taubert H, Schuh R** (1997). Regulation of *Drosophila spalt* gene expression. *Mechanisms of Development* **66**, 107-118.
- Langenhan T, Prömel S, Mestek L, Esmaeili B, Waller-Evans H, Hennig C, Kohara Y, Avery L, Vakonakis I, Schnabel R, Russ AP** (2009). Latrophilin signaling links anterior-posterior tissue polarity and oriented cell divisions in the *C. elegans* embryo. *Developmental Cell* **17(4)**, 494-504.
- Luthe K** (2012). TBA. *Dissertation*.
- Memar N** (2012). TBA. *Dissertation*.
- Minden JS, Agara DA, Sedat JW, Alberts BM** (1989). Direct cell lineage analysis in *Drosophila melanogaster* by time-lapse, 3-dimensional optical microscopy of living embryos. *Journal of Cell Biology* **109(2)**, 505-516.
- Mollereau B, Dominguez M, Webel R, Colley NJ, Keung B, de Celis JF, Desplan C** (2001). Two-step process for photoreceptor formation in *Drosophila*. *Nature* **412**, 911-913.
- Sarin S, Bertrand V, Bigelow H, Boyanov A, Doitsidou M, Poole RJ, Narula S, Hobert O** (2010). Analysis of multiple ethyl methanesulfonate-mutagenized *Caenorhabditis elegans* strains by whole-genome sequencing. *Genetics* **185(2)**, 417-30.
- Schiemann S** (2009). Etablierung eines Phänoms für *Caenorhabditis elegans*. *Diplomarbeit*.
- Schnabel R, Bischoff M, Hintze A et al.** (2006). Global cell sorting in the *C. elegans* embryo defines a new mechanism for pattern formation. *Developmental Biology* **294**, 418–431.
- Schnabel R, Hutter H, Moerman D, Schnabel H** (1997). Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: Variability of development and regional specification. *Developmental Biology* **184(2)**, 234-265.
- Sonnichsen B, Koski LB, Walsh A, Marschall P, Neumann B, Brehm M, Alleaume AM, Artelt J, Bettencourt P, Cassin E et al.** (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **434**, 462-469.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN** (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **100**, 64-119.
- Tihanyi B, Vellai T, Regos A, Ari E, Müller F, Takács-Vellai K** (2010). The *C.*

C. elegans Hox gene *ceh-13* regulates cell migration and fusion in a non-colinear way. Implications for the early evolution of Hox clusters. *BMC Developmental Biology* **10**, 78.

Timmons L, Fire A (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.

Toker A, Teng Y, Ferreira HB, Emmons SW, Chalfie M (2003). The *Caenorhabditis elegans* spalt-like gene *sem-4* restricts touch cell fate by repressing the selector Hox gene *egl-5* and the effector gene *mec-3*. *Development* **130**, 3831-3840.

Wagmaister JA, Gleason JE, Eisenmann DM (2006). Transcriptional upregulation of the *C. elegans* Hox gene *lin-39* during vulval cell fate specification. *Mechanisms of Development* **123**, 135–150.

Wang JC, Walker A, Blackwell TK, Yamamoto KR (2004). The *Caenorhabditis elegans* ortholog of TRAP240, *CeTRAP240/let-19*, selectively modulates gene expression and is essential for embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **279**(28), 29270–29277.

Wicks SR, Yeh RT, Gish WR, Waterston RH, Plasterk RH (2001). Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nature Genetics* **28**(2), 160-164.

Wilm T, Demel P, Koop HU, Schnabel H, Schnabel R (1999). Ballistic transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **229**(1-2), 31-35.

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.wormbase.org

Yoda A, Kouike H, Okano H, Sawa H (2005). Components of the transcriptional Mediator complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. *Development* **132**, 1885-1893.

Zhao J, Grant SF (2011). Advances in whole genome sequencing technology. *Current Pharm Biotechnology* **12**(2), 293-305.

Anhang

Tabelle A1: Das Zelltod-Muster von ND_20_G7.

Die vier anterioren Regionen (ABala, ABalp, ABara und ABarp) scheinen ihr normales regionales Schicksal zu haben, wohin gegen die posterioren Regionen transformiert sind.

Zelltod	ND_20_G7
CD#1 (ala)	+
CD#2 (ala)	+
CD#3 (ala)	+
CD#4 (ala)	+
CD#5 (alp)	+
CD#6 (alp)	+
CD#7 (ara)	+
CD#8 (arp)	+
CD#9 (plp)	-
CD#10 (plp)	+
CD#11 (plp)	-
CD#12 (prp)	-
CD#13 (prp)	-
CD#14 (MS)	?

Tabelle A2: Analyse des Zelltod-Musters in t3207.

Ergänzend zu den vorherigen bioinformatischen Analysen zeigt auch das Zelltod-Muster von t3207, dass diese Mutante wahrscheinlich eine Schicksalstransformation in der ABalp-Region hat.

Zelltod	NC_1_G7
CD#1 (ala)	+
CD#2 (ala)	+
CD#3 (ala)	+

Anhang

CD#4 (ala)	+
CD#5 (alp)	-
CD#6 (alp)	-
CD#7 (ara)	+
CD#8 (arp)	+
CD#9 (plp)	?
CD#10 (plp)	?
CD#11 (plp)	+
CD#12 (prp)	-
CD#13 (prp)	+
CD#14 (MS)	+

Tabelle A3: Zelltod-Muster in ND_15_B4.

Die komplette Region ABala scheint ihr Schicksal verloren zu haben. Auch die seitlich elongierenden Regionen ABplp und ABprp zeigen ein verändertes Zelltod-Muster.

Zelltod	ND_15_B4
CD#1 (ala)	-
CD#2 (ala)	-
CD#3 (ala)	-
CD#4 (ala)	?
CD#5 (alp)	+
CD#6 (alp)	+
CD#7 (ara)	+
CD#8 (arp)	?

Anhang

CD#9 (plp)	-
CD#10 (plp)	?
CD#11 (plp)	+
CD#12 (prp)	-
CD#13 (prp)	?
CD#14 (MS)	?

Verwendete Fosmide/Cosmide:

WRM067bE10
 WRM0635dB10
 WRM0638dE10
 WRM0619bH02
 F08A8
 WRM0637aC10
 WRM0626dG10
 W07B12

Verwendete Primer:

SNP-Mapping:

CE 1213 AAGCGAACCAATCAGCAG	Chromosom I links
CE 1214 TCACGCCAAAATTAATGGG	
CE 1215 ATGCAGGCATTCGACGAATC	Chromosom I Mitte
CE 1216 GTCGAAAAAGCGCACAATTC	
CE 1217 CTCATGCATGATTTTCGAGGG	Chromosom I rechts
CE1218 AAATCCAACAGGAGCAGGAC	
CE 530 AAGAGGTGTTCTTCTGCAGC	Chromosom II links
CE 531 ACCATCCACGCAGTTCATTC	
CE 1219 TCCACACTATTTCCCTCGTG	Chromosom II Mitte
CE 1220 GAGCAATCAAGAACCGGATC	
CE 1221 TTCCCATTTCCTCCCAG	Chromosom II rechts
CE 1222 TCAAAAACCCAGACACTGG	

Deletion *sem-4(tm547)*:

CE 3523 AAAAACATTAGCATCCCGTAGTA
 CE 3524 GTGTCGTCGTTGGAGTTGGCATAA